

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Μελέτη της παραγωγής
λιπιδίων και λοιπών προϊόντων
υψηλής προστιθέμενης αξίας
κατά την ανάπτυξη του μύκητα
Thamnidium elegans CCF-1465
σε ανανεώσιμα υποστρώματα
χαμηλού κόστους»*

ΑΡΧΟΝΤΟΥΛΑ Σ. ΓΕΡΟΥΜΑΤΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής:

ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ (Αναπληρωτής Καθηγητής)

ΑΘΗΝΑ 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Μελέτη της παραγωγής λιπιδίων και λοιπών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας κατά την ανάπτυξη του μύκητα *Thamnidium elegans* CCF-1465 σε ανανεώσιμα υποστρώματα χαμηλού κόστους»*

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: ΑΡΧΟΝΤΟΥΛΑ Σ. ΓΕΡΟΥΜΑΤΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής: ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ (Αναπληρωτής Καθηγητής)

ΑΘΗΝΑ 2015

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Μελέτη της παραγωγής λιπιδίων και λοιπών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας κατά την ανάπτυξη του μύκητα *Thamnidium elegans* CCF-1465 σε ανανεώσιμα υποστρώματα χαμηλού κόστους»*

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: ΑΡΧΟΝΤΟΥΛΑ Σ. ΓΕΡΟΥΜΑΤΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής: ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ *(Αναπληρωτής Καθηγητής)*

ΚΟΥΤΙΝΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΗΣ *(Επίκουρος Καθηγητής)*

ΣΤΟΦΟΡΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ *(Αναπληρωτής Καθηγητής)*

Περίληψη

Η παρούσα ερευνητική μελέτη έχει στόχο τη διερεύνηση της βιοφυσιολογικής και της βιοχημικής συμπεριφοράς του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* CCF-1465 και συγκεκριμένα της ικανότητας του να συσσωρεύει ενδοκυτταρικό λίπος πλούσιο σε γ -λινολενικό οξύ (GLA), ένα λιπαρό οξύ με σημαντικές διατροφικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής μικροβιακής μάζας, βιοσύνθεσης ενδοκυτταρικού λίπους καθώς και η διερεύνηση της σύστασης των μικροβιακών λιπιδίων, η ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους σε επιμέρους κλάσματα, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και του είδους των ενδοπολυσακχαριτών, η μέτρηση της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης και ο προσδιορισμός του βαθμού αποχρωματισμού του αποβλήτου ή του συνδυασμού αυτών, κατά την καλλιέργεια του μύκητα σε ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Συγκεκριμένα, τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μελάσα (αποβλήτο της βιομηχανίας ζάχαρης), η εμπορική σακχαρόζη και η ακάθαρτη γλυκερόλη. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις βυθού με τις εξής αρχικές συγκεντρώσεις ολικών σακχάρων (TS₀) ως πηγής άνθρακα: 50 g/L, 80 g/L, 100 g/L και 120 g/L μελάσας και 50 g/L σουκρόζης. Προκειμένου να ανέλθει ο λόγος C/N σε υψηλότερα επίπεδα για να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με συνδυασμό TS₀: 50 g/L μελάσας : 40 g/L ακάθαρτης γλυκερόλης. Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, ο μύκητας παρουσίασε σημαντική κυτταρική αύξηση σε όλα τα υποστρώματα, καθώς και ικανοποιητική παραγωγή μικροβιακού λίπους, πλούσιο σε GLA, σε ορισμένα από αυτά. Συγκεκριμένα, στο μέσο με TS₀: 50 g/L μελάσας και 40 g/L γλυκερόλης, ο μύκητας παρήγαγε 29,4 g/L βιομάζας και 13,3 g/L ενδοκυτταρικού λίπους με περιεκτικότητα σε GLA που έφτασε τα 998 mg/L. Παρόμοια αποτελέσματα σημειώθηκαν κατά την καλλιέργεια του μύκητα στο υπόστρωμα μελάσας με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 80 g/L, με παραγωγή βιομάζας 31,9 g/L, ενδοκυτταρικό λίπος 11,6 g/L και 766 mg/L GLA. Αντίθετα, στα υποστρώματα με βάση τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα (με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 50, 100, 120 g/L, ο μύκητας εμφάνισε παρόμοια κυτταρική αύξηση (21,8-31,3 g/L) αλλά παρήγαγε χαμηλότερα ποσά λίπους (3,3 - 4,4 g/L) με χαμηλότερες συγκεντρώσεις GLA αντίστοιχα. Ωστόσο, στο υπόστρωμα με βάση την σακχαρόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, ο μύκητας αναπτύχθηκε ικανοποιητικά και παρήγαγε σημαντικές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους με σημαντική περιεκτικότητα σε GLA, συγκεκριμένα παρήγαγε 19,6 g/L βιομάζας, 7,7 g/L ενδοκυτταρικού λίπους και 440 mg/L GLA. Η εξέλιξη της κατανάλωσης της πηγής άνθρακα και της πρωτεΐνης του υποστρώματος καταγράφηκε σε όλα τα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης αλλά δεν παρατηρήθηκε πλήρης εξάντλησή τους σε όλες τις περιπτώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα ο μύκητας εμφάνισε ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά στη συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών περί των 2,4-7,4 g/L με μέγιστη συγκέντρωση συσσώρευσης ενδοπολυσακχαριτών στο υπόστρωμα μελάσας με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 100 g/L όπου δεν παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους περί των 4,0 g/L. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα. Από τις αναλύσεις αυτές στην πλειοψηφία των δειγμάτων προκύπτει ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά (%) γ -λινολενικού οξέος (GLA) επί των ολικών λιπαρών οξέων σημειώνονται κατά την αρχή της ζύμωσης

όταν η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους είναι χαμηλή. Το επικρατέστερο λιπαρό οξύ επί των ολικών λιπαρών οξέων ήταν το ελαϊκό οξύ (C18:1) με ποσοστά που κυμαίνονταν μεταξύ 18–51% και ακολούθησε το παλμιτικό (C16:0) και το λινελαϊκό οξύ (C18:2), τα οποία απαντώνταν επίσης σε σημαντικές ποσότητες. Επιπλέον, κατά την κλασμάτωση των λιπιδίων παρατηρήθηκε ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των ολικών λιπιδίων (TL) και ακολουθούν τα σφιγγογλυκολιπίδια (S-G) και τα φωσφολιπίδια (P) με χαμηλότερα ποσοστά. Ακόμη στα μέσα αύξησης με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα σημειώθηκε αποχρωματισμός 37,2-69,0 % ενώ κατά την καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα μελάσας-γλυκερόλης σημειώθηκε αποχρωματισμός περί του 33%. Ολοκληρώνοντας πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης σε όλες τις βιομετατροπές όπου η μέγιστη ενεργότητα ήταν 0,32 U/mL κατά την καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα μελάσας, αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 100 g/L.

Λέξεις-κλειδιά: *Thamnidium elegans*, Μελάσα, Γλυκερόλη, Ζάχαρη, Μικροβιακό λίπος, γ -Λινολενικό οξύ, Ενδοπολυσακχαρίδια, Ιμβερτάση, Αποχρωματισμός.

"Study of lipid production and other high added value products by the Zygomycete *Thamnidium elegans* CCF-1465 during growth on renewable low-cost substrates."

Abstract

The aim of the present study was to investigate the biochemical behavior and ability of a Zygomycetes strain, namely *Thamnidium elegans* CCF-1465, to accumulate single cell oil (SCO) rich in γ -linolenic acid (GLA), an unsaturated fatty acid of nutritional and medical importance. Specifically, the capacity of the strain to produce microbial mass, the biosynthesis of intracellular oil and the investigation of the composition of the total microbial lipids and their fractions, the determination of the intracellular polysaccharides (IPS), the activity of extracellular invertase and the decolorization of the waste or their combination were studied. The substrates used were molasses (waste from sugar industry), commercial sucrose and raw glycerol. Experiments were conducted in shake-flasks with the following initial total sugars concentrations (TS₀) as carbon source: 50 g/L, 80 g/L, 100 g/L and 120 g/L molasses and 50 g/L sucrose. In order to reach the ratio C/N at higher levels to promote single cell oil accumulation a bioconversion with substrate the combining of TS₀:50 g/L molasses : 40 g/L glycerol was performed. The strain presented significant cell growth in every substrates, and in some of them, lipid accumulation was satisfactory. Specifically, the strain produced 29.4 g/L biomass and 13.3 g/L SCO and with significant high GLA content (998 mg/L), when was cultivated on TS₀:50 g/L of molasses and 40 g/L glycerol. Similar results were achieved during the culture of the strain in molasses substrate with initial sugar concentration 80g / L, with biomass 31,9 g/L, SCO at 11.6 g/L and 766 mg/L GLA. Conversely, substrates based on molasses as unique carbon source (with initial sugar concentration 50, 100, 120 g/L, the strain showed similar cell growth (21,8-31,3 g/L) but lower amounts of SCO (3,3-4,4 g/L) and lower amounts of GLA were produced. However, when cultivated on substrate based on sucrose, as unique carbon source, the strain grew well and produced significant quantities of SCO with significant GLA content, in particular 19.6 g/L biomass, 7.7 g/L SCO and 440 mg/L GLA were produced. Furthermore, the progress of the consumption of carbon source and the protein from substrate were recorded in all growth media, but full depletion was not observed in all cases. Notably, the strain showed satisfactory results in accumulating intracellular polysaccharides from 2,4 to 7,4 g/L in all substrates with maximum accumulation in molasses, with initial sugar concentration 100 g/L, but no significant production of SCO was observed (4,0 g/L). Moreover, analyzing the composition of SCO into fatty acids, the majority of the samples showed that percentage (%) of γ - linolenic acid (GLA) on total fatty acids content was higher in the beginning of the fermentation when production of SCO was lower. In all experiments the predominant fatty acid of total fatty acids was oleic acid (C18: 1) that ranged between 18 to 51% followed by palmitic (C16: 0) and linoleic acid (C18: 2), which also were in significant quantities. Furthermore, during the fractionation of lipids was observed that the neutral lipids (N) constituted the largest percentage of total lipids (TL) followed by sphingo-glycolipids (S-G) and phospholipids (P) in lower rates. Additionally, in all substrates with molasses as the sole carbon source, the decolorization was around 37.2 - 69,0 % while in the

cultivation of the strain in molasses-glycerol substrate was 33%. Finally, the determination of the extracellular invertase activity was performed. Results showed that maximum extracellular invertase activity was 0.32 U/mL during the cultivation of the strain on molasses medium, with initial concentration of sugars 100 g/L.

Keywords: *Thamnidium elegans*, Molasses, Glycerol, Sucrose, Single Cell Oil, γ -linolenic acid, Intracellular Polysaccharides Invertase, Decolorization.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μετά το τέλος της μεταπτυχιακής μου μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μαζί και καθένα ξεχωριστά όσους με βοήθησαν να γίνει άλλος ένας στόχος μου πραγματικότητα. Η παρούσα ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου».

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή και επιβλέποντα κ. Παπανικολάου για την επίβλεψη, την εμπιστοσύνη, τις πολύτιμες συμβουλές του και τις ευκαιρίες που μου έδωσε κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας από το 2013. Ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να απευθύνω στον επίκουρο καθηγητή κ. Απόστολο Κουτίνα και στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νικόλαο Στοφόρο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Με ιδιαίτερη εκτίμηση και απεριόριστες ευχαριστίες θα ήθελα να αναφερθώ και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας που είχα την τύχη να συνεργαστώ. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ευάγγελο Ξενόπουλο, του οποίου η συμπαράσταση ήταν σημαντική και οι παρατηρήσεις και συμβουλές του εύστοχες και αποτελεσματικές για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Για την πολύτιμη συνεργασία και την στήριξη τους σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο ευχαριστώ, επίσης, τις υποψήφιες διδάκτορες Σ. Μάινα, Α. Παλαιογιώργου, Μ. Αλεξανδρή, Β. Καχριμανίδου και Ρ. Φίλιππούση. Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον μεταδιδακτορικό ερευνητή κ. Δημήτρη Σαρρή για την υπομονή, την συνεχή καθοδήγηση και τη συμπαράσταση του.

Κυρίως, όμως, οφείλω να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες και τους συμφοιτητές μου για το δημιουργικό και ευχάριστο κλίμα που επικράτησε στο χώρο του εργαστηρίου καθώς και όλα τα παιδιά του μεταπτυχιακού για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί εντός και εκτός του πανεπιστημίου.

Κρατάω πάντα για το τέλος τους δικούς μου ανθρώπους τους γονείς μου, Νίκη και Σπύρο, για την στήριξη και την συνεχή παρότρυνση τους καθώς και για την εμπιστοσύνη που δείχνουν στο πρόσωπό μου σε καθημερινή βάση. Σε αυτούς λοιπόν αφιερώνω με μεγάλη μου χαρά την παρούσα μελέτη.

Α.Γερολυμάτου

Αθήνα 2015

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.	12
1.1 Τα βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα.	12
1.2 Ανανεώσιμες Πηγές Άνθρακα και Ενέργειας.	14
1.3 Η Μελάσα (Ορισμός & Γενικά Χαρακτηριστικά).	16
1.4 Σύσταση μελάσας.	17
1.5 Παραγωγή μελάσας.	18
1.6 Χαρακτηριστικά και σύσταση αποβλήτων προερχόμενα από επεξεργασία μελάσας.	19
1.7 Μέθοδοι αποικοδόμησης και βιο-αποικοδόμησης μελανοϊδινών.	21
1.8 Παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων με υπόστρωμα τη μελάσα.	22
1.9 Η Γλυκερόλη.	23
1.10 Διάμεσος μεταβολισμός της γλυκόζης και της γλυκερόλης στο μικροβιακό κύτταρο.	25
1.11 Βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον των ελαιογόνων μικροοργανισμών.	27
1.12 Σημασία και βιοσύνθεση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs).	28
1.13 Η συμβολή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) στον ανθρώπινο οργανισμό.	30
1.14 Το γ- Λινολενικό οξύ (GLA, C18:3, ω-6).	31
1.15 Φυσιολογία των ελαιογόνων μικροοργανισμών.	32
1.16 Βιοσύνθεση λιπιδίων από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς.	34
1.17 Η κλάση των Ζυγομυκήτων –Το στέλεχος <i>Thamnidium elegans</i> .	37
2. Σκοπός.	38
3. Υλικά και μέθοδοι.	39
3.1. Το βιολογικό υλικό.	39
3.2. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων.	39
3.3. Μέθοδοι Ανάλυσης.	41
3.3.1. Προσδιορισμός pH.	41
3.3.2 Προσδιορισμός παραγόμενης βιομάζας.	41
3.3.3. Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων με όξινη υδρόλυση και τη μέθοδο DNS.	42
3.3.4 Προσδιορισμός σακχάρων και γλυκερόλης με HPLC.	42
3.3.5 Προσδιορισμός ολικού αζώτου και πρωτεΐνης με τη μέθοδο Kjeldhal.	43
3.3.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών υποστρώματος με τη μέθοδο Lowry.	44
3.3.7 Προσδιορισμός αποχρωματισμού μελάσας.	44
3.3.8 Προσδιορισμός ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμπερτάσης.	45
3.3.9 Μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους.	45
3.3.9.1 Εκχύλιση λίπους.	46
3.3.9.2 Κλασμάτωση λιπιδίων (fractionation).	46
3.3.9.3 Μεθυλεστεροποίηση.	47
3.3.9.4 Υπολογισμός δείκτη ακορεστότητας λιπαρών οξέων (Unsaturation index-UI).	48
3.3.10 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών.	48
4. Αποτελέσματα.	49
4.1. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Thamnidium elegans</i> σε υπόστρωμα μελάσας (TS ₀ =50 g/L).	50

4.1.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.	50
4.1.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου και ανά μονάδα βιομάζας.	54
4.1.3.Προσδιορισμός ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμβερτάσης.	56
4.1.4.Προσδιορισμός βαθμού αποχρωματισμού υποστρώματος.	57
4.2. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Thamnidium elegans</i> σε υπόστρωμα σακχαρόζης (TS ₀ =50 g/L).	58
4.2.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.	58
4.2.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου και ανά μονάδα βιομάζας.	61
4.2.3.Προσδιορισμός ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμβερτάσης.	63
4.3. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Thamnidium elegans</i> σε υπόστρωμα μελάσας (TS ₀ =80 g/L).	64
4.3.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.	64
4.3.2. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου και ανά μονάδα βιομάζας.	67
4.3.3.Προσδιορισμός ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμβερτάσης.	69
4.3.4.Προσδιορισμός βαθμού αποχρωματισμού υποστρώματος.	70
4.4. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Thamnidium elegans</i> σε υπόστρωμα μελάσας (TS ₀ =100 g/L).	71
4.4.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.	71
4.4.2. Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου και ανά μονάδα βιομάζας.	75
4.4.3.Προσδιορισμός ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμβερτάσης.	76
4.4.4.Προσδιορισμός βαθμού αποχρωματισμού υποστρώματος.	77
4.5. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Thamnidium elegans</i> σε υπόστρωμα μελάσας (TS ₀ =120 g/L).	78
4.5.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.	78
4.5.2. Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου και ανά μονάδα βιομάζας.	82
4.5.3. Προσδιορισμός ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμβερτάσης.	83
4.5.4. Προσδιορισμός βαθμού αποχρωματισμού υποστρώματος.	84
4.6. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Thamnidium elegans</i> σε συνδιασμό υποστρώματος μελάσας (TS _{molasses} =50 g/L) και γλυκερόλης (Sglycerol=40 g/L).	85
4.6.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.	85
4.6.2. Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου και ανά μονάδα βιομάζας.	89
4.6.3. Προσδιορισμός ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμβερτάσης.	90
4.6.4. Προσδιορισμός βαθμού αποχρωματισμού υποστρώματος.	91
5. Συζήτηση.	92
6.Βιβλιογραφία.	104

Συντομογραφίες

- Ακετυλο-CoA:** Acetyl-Coenzyme A, Ακετυλο- συνένζυμο A
- ALA:** Alpha-linolenic acid, α-λινολενικό οξύ
- AMP:** Adenosine monophosphate, Μονοφωσφορική αδενοσίνη
- ATP-CL:** ATP-citrate lyase, ATP-κιτρική λυάση
- BOD:** Biochemical oxygen demand, Βιοχημική απαίτηση σε οξυγόνο
- BSA:** Bovine Serum Albumin, Αλβουμίνη
- COD:** Chemical oxygen demand, Χημική απαίτηση σε οξυγόνο
- DHA:** Docosahexaenoic acid, Εικοσιδυεξανοϊκό οξύ
- DPA:** Docosapentaenoic acid, Εικοσιδυοπεντανοϊκό οξύ
- D6D:** Delta-6-desaturase, Δ6 αποκορεσμάση
- EFAs:** Essential Poly-Unsaturated Fatty Acids, Απαραίτητα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
- EPA:** Eicosapentaenoic acid, Εικοσιπεντανοϊκό οξύ
- FAMES:** Fatty acid methyl esters, Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων
- FACEs:** Λιπαροί εστέρες του CoA μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας
- GK:** Κινάση της γλυκερόλης
- G+S:** Glycolipids & Sphingolipids, Γλυκολιπίδια & Σφιγγολιπίδια
- G3PDH:** Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, Αποκορεσμάση της 3-φωσφο-γλυκερόλης
- GC:** Gas chromatography, Αέρια Χρωματογραφία
- GLA:** Gamma-linolenic acid, γ- λινολενικό οξύ
- GloI:** Glycerol, Γλυκερόλη
- Gluc:** Glucose, Γλυκόζη
- HPLC:** High Performance Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
- ICDH:** Isocitrate dehydrogenase, Ισοκιτρική αφυδρογονάση
- IMP:** Inosine monophosphate, Μονοφωσφορική ινοσίνη
- IPS:** Intracellular polysaccharides, Ενδοπολυσακχαρίδια
- LC-PUFAs:** Long Chain Poly-Unsaturated Fatty Acids, Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας

- L:** Lipids, Λιπίδια
- MnP:** Εξαρτώμενη μαγνανική υπεροξιδάση
- MIP:** Μη εξαρτώμενη μαγνανική υπεροξιδάση
- NL:** Neutral Lipids, Ουδέτερα λιπίδια
- P:** Phospholipids, Φωσφολιπίδια
- PDA:** Potato Dextrose Agar, Άγαρ πατάτας- δεξτρόζης
- PGE1:** Προσταγλαδίνη E1
- PUFAs:** Poly-Unsaturated Fatty Acids, Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
- S:** υπόστρωμα
- Scon:** καταναλωθέν υπόστρωμα
- SCO:** Single Cell Oils, Έλαια μονοκύτταρων οργανισμών
- SCP:** Single cell protein, Πρωτεΐνη μονοκύτταρων οργανισμών
- TAG:** Triglyceride, Τριγλυκερίδια
- TCA cycle:** Tricarboxylic acid cycle, Κύκλος τρικαρβοξυλικών οξέων
- TFA:** Total Fatty Acids, Ολικά λιπαρά οξέα
- TL:** Total Lipids, Ολικά λιπίδια
- TSo:** Αρχική συγκέντρωση συνολικών σακχάρων βιομετατροπής
- U.I.:** Unsaturation Index, Δείκτης Ακορεστότητας
- X:** Total biomass, Ολική βιομάζα
- Xf:** Lipid-free biomass, Ελεύθερη λιπιδίων βιομάζα
- YL/Scon %:** Συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (%)
- YIPS/X%:** Intracellular polysaccharides in total biomass (wt/wt intracellular polysaccharides / total biomass, %), Συντελεστής απόδοσης ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρής μικροβιακής μάζας (wt/wt ενδοπολυσακχαρίτες/ ξηρή βιομάζα, %)
- YL/X%:** Lipid in total biomass (wt/wt lipids/ total biomass, %), Συντελεστής απόδοσης λιπιδίων επί ξηρής μικροβιακής μάζας (wt/wt λίπος/ ξηρή βιομάζα, %)

1.Εισαγωγή

1.1 Τα βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα

Ως απόβλητο (waste) νοείται οποιοδήποτε προϊόν της βιομηχανίας του οποίου η περαιτέρω επεξεργασία θεωρείται οικονομικά ασύμφορη. Ως παραπροϊόν (co-product) θεωρείται ένα βιομηχανικό προϊόν ευτελούς αξίας το οποίο παράγεται παραπλεύρως του κύριου προϊόντος της βιομηχανικής διεργασίας. Στη σημερινή εποχή η διαχείριση και η επεξεργασία των βιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων αποτελεί σημαντικό και δυσεπίλυτο πρόβλημα καθώς ο όγκος τους αυξάνει ραγδαία τα τελευταία χρόνια με άμεσες δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Είναι γεγονός ότι περίπου το 15% κ.β όλων των εδώδιμων προϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων απολήγουν στην κατηγορία των αποβλήτων.

Τα βιομηχανικά απόβλητα είναι συνήθως παραπροϊόντα της παραγωγικής διαδικασίας, ακαθαρσίες της πρώτης ύλης και λάσπες που παράγονται κατά την διάρκεια των βιομηχανικών διεργασιών. Τα βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα προέρχονται από τη δραστηριότητα διαφόρων Γεωργικών Βιομηχανιών και Επιχειρήσεων Μεταποίησης, Επεξεργασίας Τροφίμων και Γεωργικών Προϊόντων. Πρόκειται για παραπροϊόντα και απόβλητα, των οποίων ο όγκος αυξάνει με ταχύτατους ρυθμούς (Koutinas *et al.*, 2014).

Η διαχείριση των εν λόγω αποβλήτων και παραπροϊόντων προκαλεί τεράστια προβλήματα στην βιομηχανία διότι αποτελούν πηγή ρύπανσης του περιβάλλοντος και η μετακομιδή τους απαιτεί υψηλό κόστος. Στις ανεπτυγμένες χώρες, τα δύο τρίτα των οργανικών αποβλήτων και παραπροϊόντων παράγονται από τις γεωργικές και βιομηχανικές εκμεταλλεύσεις. Συγκεκριμένα στις ΗΠΑ παράγονται ετησίως 10 δις τόνοι στερεών αποβλήτων. Υπολογίζονται περίπου 700 κιλά αστικών απορριμμάτων ετησίως ανά κάτοικο, δυο με τρεις φορές περισσότερα από όσα στις υπόλοιπες ανεπτυγμένες χώρες.

Τα στερεά απόβλητα δύναται να είναι απόβλητα που προέρχονται από το φυτικό υλικό και στερεά απόβλητα τύπου «ληγμένων» εδώδιμων προϊόντων που είναι πλούσια σε περιεκτικότητα σακχάρων όπως τα προερχόμενα από ληγμένα προϊόντα (παιδικές τροφές, απορριφθέντα προϊόντα κατά την παραγωγική διαδικασία, απόβλητη ζάχαρη, και άλλα). Για τον συγκεκριμένο τύπο απόβλητων, η βιομηχανία πληρώνει από 0,1-0,5 ευρώ ανά κιλό αποβλήτου για να απαχθούν αυτά τα απόβλητα, τα οποία συνήθως σε επόμενο στάδιο υφίστανται διεργασία κομποστοποίησης (Papanikolaou & Aggelis, 2010).

Τεράστιες είναι και οι ποσότητες των υγρών ή ημιστερεών αποβλήτων τα οποία παράγονται κατά την γεωργική πρακτική και στον βιομηχανικό χώρο. Αυτά μπορεί να είναι απόβλητα:

- πλούσια σε υδατάνθρακες (σάκχαρα απλά ή σύνθετα),
- πλούσια σε λίπος (βιομηχανικά λίπη και έλαια), όπου προέρχονται από σφαγεία, εστιατόρια και βιομηχανίες παρασκευής έτοιμων εδεσμάτων
- υγρά απόβλητα ελαιουργείων, τα οποία είναι πλούσια σε σάκχαρα, οργανικά οξέα, φαινολικά συστατικά και άλατα (Koutinas *et al.*, 2014).

Η σύσταση τους ποικίλλει ανάλογα με την πηγή προέλευσης τους και το στάδιο της κατεργασίας από το οποίο προέρχονται. Χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα

υγρασίας (70-80%) και η υπόλοιπη ξηρά ουσία αποτελείται από βιοαποικοδομήσιμη ύλη.

Ο σύγχρονος βιομηχανικός τρόπος ζωής έχει οδηγήσει στην αύξηση των παραγόμενων λυμάτων και αποβλήτων, ιδιαίτερα αυτών που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία, με σοβαρές επιπτώσεις στο οικοσύστημα. Η ανεξέλεγκτη διάθεση των αποβλήτων είναι μόνιμη απειλή για το περιβάλλον, τους υδατικούς πόρους, το έδαφος και τη δημόσια υγεία. Κατά την παραμονή τους, τα απόβλητα και τα παραπροϊόντα αποσυντίθενται αρκετά γρήγορα, παράγοντας οργανικά οξέα και δύσοσμα συστατικά, κάνοντας δύσκολη την αποθήκευση και τα χρήση τους. Τα λύματα είναι πλούσια σε οργανικά θρεπτικά συστατικά και όταν αποβάλλονται στους υδάτινους αποδέκτες (θάλασσα, λίμνες, ποτάμια), δημιουργούν μεγάλες απαιτήσεις σε οξυγόνο, προκειμένου να διασπαστούν αερόβια από βακτήρια και μύκητες. Η διαρροή των στοιχείων αυτών προκαλεί το φαινόμενο του ευτροφισμού με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ισορροπία του οικοσυστήματος. Επίσης η διαρροή αζώτου προς τα υπόγεια ύδατα, τα καθιστά ακατάλληλα για πόση. Ακόμη ένα πρόβλημα που δημιουργείται είναι η έκλυση αερίων όπως η αμμωνία και το μεθάνιο, τα οποία ρυπαίνουν την ατμόσφαιρα (Lin *et al.*, 2015).

Τα τελευταία χρόνια, έχοντας υπόψη την ρύπανση του περιβάλλοντος, καθώς και



Εικόνα 1. Ανακύκλωση Βιομηχανικών Αποβλήτων
(Πηγή-δεν διατίθεται)

τα διάφορα οικονομικά κίνητρα και την ανάγκη για τη διατήρηση της ενέργειας και των νέων υλικών, καινούριες μέθοδοι και πολιτικές έχουν προταθεί για την ανάκτηση, τη βιομετατροπή και τη χρησιμοποίηση των θρεπτικών συστατικών των αποβλήτων της επεξεργασίας τροφίμων. Η επεξεργασία των αποβλήτων και των παραπροϊόντων

αποβλέπει στην ανακύκλωσή τους, στην χρησιμοποίησή τους σε βιομηχανίες, τη μετατροπή τους σε προϊόντα υψηλής

προστιθέμενης αξίας ή και τη χρήση ως ζωοτροφές μετά από βιολογική επεξεργασία.

Η χρήση των ανανεώσιμων γεωργικών και βιομηχανικών απόβλητων ως πρώτες ύλες για την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων βοηθούν στη μείωση του κόστους παραγωγής και την εξάρτηση από τις καλλιέργειες τροφίμων (Zahari *et al.*, 2012). Πολλές βιοτεχνολογικές διεργασίες έχουν αναπτυχθεί, με σπουδαιότερες τις μικροβιακές ζυμώσεις, για την αξιοποίησή των παραπροϊόντων. Τα παραπροϊόντα μπορούν να αντικαταστήσουν τα καθαρά σάκχαρα ως πρώτη ύλη στις μικροβιακές ζυμώσεις, συμβάλλοντας στη μείωση του κόστους των βιοδιεργασιών (Peters, 2006)

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω τα βιομηχανικά απόβλητα και παραπροϊόντα θα πρέπει να θεωρούνται περισσότερο ως υπολείμματα τα οποία επιδέχονται περαιτέρω επεξεργασία γιατί δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα και να έχουν βιοτεχνολογικές και χημικές εφαρμογές. Η εφαρμογή τους χαρακτηρίζεται ως διττή αφού συμβάλλουν εξίσου στη μείωση του ρυπαντικού φορτίου και στην παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων. Το κέδρος για την βιομηχανία καθώς και το όφελος για την διατήρηση της περιβαλλοντικής υγείας είναι πολύ μεγάλο με την ενδεχόμενη εφαρμογή βιοδιεργασιών προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

1.2 Ανανεώσιμες Πηγές Άνθρακα και Ενέργειας

Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στις μικροβιακές ζυμώσεις φέρουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε πλήθος υποστρωμάτων. Τα υποστρώματα αυτά μπορεί να είναι υδρόφιλα συστατικά όπως σάκχαρα και παρομοίως μεταβολιζόμενα συστατικά όπως πολυσακχαρίδια και άμυλο (Aggelis *et al.*, 1996; Chen & Chang, 1997) και η γλυκερόλη, ή υδρόφοβα συστατικά όπως λίπος (Aggelis & Sourdis, 1997), μίγματα ελεύθερων λιπαρών οξέων (Papanikoalou *et al.*, 2001; 2002a; Mlickova *et al.*, 2004a; b) και n-αλκάνια. Τα υποστρώματα αυτά χαρακτηρίζονται ως ανανεώσιμες πηγές άνθρακα και ενέργειας λόγω των υψηλής αξίας συστατικών τους όπως τα σάκχαρα, οι πρωτεΐνες και λίπη που μπορούν να βιομετατραπούν σε πρωτεΐνη, βιοαέριο, λίπασμα, οργανικά οξέα, λιπίδια, οργανικά οξέα, βιοπλαστικά, βιοαιθανόλη, 1,3-προπανοδιόλη και πληθώρα άλλων προϊόντων (Peters, 2006).

Γενικά, οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται σαν πηγή σακχαρούχων υλικών τα οποία δύναται να αξιοποιηθούν μέσω της βιοτεχνολογικής οδού ταξινομούνται στις εξής, τέσσερις κατηγορίες:

- ❖ Άμεσα ζυμώσιμες πρώτες ύλες: Τα απλά σάκχαρα ή ολιγοσακχαρίδια όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η σακχαρόζη, και η λακτόζη τα οποία ζυμώνονται απευθείας ή διασπώνται πριν από τη ζύμωση μέσω απλών υδρολυτικών διεργασιών. Στην κατηγορία των άμεσα ζυμώσιμων πρώτων υλών κατατάσσονται η σακχαρόζη, το σακχαροκάλαμο, τα σακχαρότευτλα καθώς και τα προϊόντα επεξεργασίας αυτών, όπως είναι ο χυμός του σακχαροκάλαμου και η μελάσα. Η σακχαρόζη ή σουκρόζη είναι δισακχαρίτης αποτελούμενος από δομικές μονάδες γλυκόζης και φρουκτόζης ενωμένες μεταξύ τους με α-D-γλυκοζιτικό δεσμό. Είναι μη ανάγον σάκχαρο, δεν είναι ζυμώσιμη απ' ευθείας, αλλά μετά από υδρόλυση. Η υδρόλυση της σακχαρόζης γίνεται με οξέα και με ένζυμα. Η ενζυμική υδρόλυση γίνεται με το ένζυμο ιμπερτάση σπάζοντας το γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ του υδρογόνου του ενός άνθρακα και του υδροξυλίου του άλλου απομακρύνοντας ένα μόριο νερού και η αντίδραση αυτή καλείται ιμπερτοποίηση. Στα ένζυμα είναι δύσκολος ο ακριβής προσδιορισμός των μοριακών βαρών τους. Έτσι, η συγκέντρωσή τους εκτιμάται σε σχέση με τη συγκεκριμένη δράση την οποία καταλύουν. Η ενζυμική δράση μετράται με τη **μονάδα ενεργότητας** (Unit) η οποία ορίζεται ως το ποσό του ενζύμου που προκαλεί συγκεκριμένη αλλαγή στο υπόστρωμα υπό ορισμένες συνθήκες. Για την ιμπερτάση ως 1 Unit ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου η οποία υδρολύει 1 μμole υποστρώματος (σακχαρόζη) ανά λεπτό, υπό συνθήκες περισσειας υποστρώματος, σε pH 4.5 και θερμοκρασία 50 °C.
- ❖ Αμυλούχες πρώτες ύλες: Τα περισσότερα αμυλούχα προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν υπόστρωμα για τις διάφορες ζυμωτικές διεργασίες. Το άμυλο είναι πολυμερές της γλυκόζης και αποτελείται από δύο τύπους μορίων, την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Σε σύγκριση με τη ζύμωση σακχάρων η βιομετατροπή του αμύλου σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας (π.χ. κίτρικο οξύ, αιθανόλη κλπ) είναι μια διαδικασία πολύπλοκότερη και ολοκληρώνεται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο γίνεται η υδρόλυση του αμύλου λαμβάνει χώρα η μετατροπή του σε σάκχαρα είτε με τη χρήση ενός αμυλολυτικού μικροοργανισμού, είτε με την προσθήκη ενζύμων ενώ στο δεύτερο στάδιο γίνεται η βιομετατροπή των σακχάρων σε τελικά προϊόντα.

- ❖ **Κυτταρινούχα υλικά:** Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά (ξύλο, καλάμια, άχυρα) αποτελούν την πιο άφθονη ανανεώσιμη πηγή ενέργειας σε βιομηχανικό επίπεδο. Παρόλο που η παγκόσμια παραγωγή φυτικής βιομάζας είναι ιδιαίτερα υψηλή, η χρήση των κυτταρινούχων υλικών δεν είναι πάντοτε πρακτική λόγω της εποχιακής διαθεσιμότητάς τους, του υψηλού κόστους μεταφοράς και αποθήκευσης των μεγάλων ποσοτήτων οργανικών υλικών αλλά και λόγω των δυσκολιών που προκύπτουν κατά την κατεργασία της λιγνοκυτταρίνης.
- ❖ **Βιομηχανικά απόβλητα πλούσια σε υδατάνθρακες:** Στην κατηγορία αυτή υπάγονται τα υγρά που αποβάλλονται κατά το πλύσιμο, καθάρισμα, επεξεργασία και κονσερβοποίηση φρούτων και λαχανικών. Η συγκέντρωση των υδατανθράκων ποικίλει ανάλογα την προέλευση και μπορεί να φτάσει έως και σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις της τάξης του 10-15% (w/v). Σημειώνεται ότι στην Ελλάδα δραστικοποιούνται πολλές τέτοιου είδους βιομηχανίες, και η αξιοποίηση των αποβλήτων αυτού του τύπου μέσω της βιοτεχνολογικής οδού είναι αμελητέα. Οι υδατάνθρακες που περιέχουν μπορεί να είναι είτε απλοί όπως μελάσες, σιρόπια γλυκόζης, απόβλητα βιομηχανιών παρασκευής παγωτών και γλυκών, βιομηχανιών φρούτων και τυροκομείων, είτε σύνθετοι όπως άμυλο και πηκτινικές ύλες. Τα απόβλητα αυτά ενίοτε αντιμετωπίζονται κατά τρόπο ορθολογικό από τους ενυπάρχοντες Σταθμούς Βιολογικού Καθαρισμού ή στους κατά τόπους σηπτικούς βόθρους.

Ενίοτε για την απορρύπανση των αποβλήτων αυτών πραγματοποιείται Προηγμένου Τύπου Επεξεργασία, που συγχρόνως οδηγεί στην παραγωγή :

- Μονοκυτταρικού λίπους (SCO) (*Thamnidium elegans*, *Mortierella isabellina*) και μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP) (*Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*),
- Ενδιάμεσων οργανικών οξέων του κύκλου του Krebs, με κυριότερο το κιτρικό (*Aspergillus niger*, *Candida sp*, *Yarrowia lipolytica*),
- Μικροβιακής προέλευσης αιθανόλης (βιοαιθανόλης), (*Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*),
- Μικροβιακής προέλευσης διαλυτών (μέσω ζύμωσης A.B.E με χρήση του *Clostridium butyricum*), Αμινοξέων με κυριότερο το γλουταμινικό και Ενζύμων.

Πέραν καμίας αμφιβολίας, οι μικροοργανισμοί αποτελούν σημαντικό εργαλείο στα χέρια των επιστημόνων καθιστώντας εφικτή την παραγωγή, μέσω βιομετατροπής ή ζυμωτικών διεργασιών, προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Για το λόγο αυτό, το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την αξιοποίηση βιομηχανικών αποβλήτων ως υποστρωμάτων για την καλλιέργεια τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα σακχαρούχα υποστρώματα προερχόμενα ως απόβλητα ή παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε σάκχαρα αποτελούν άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ενώ υπό δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας δύναται να ευνοηθεί η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους. Η δυνατότητα αυτή βρίσκει εφαρμογή στην παρούσα ερευνητική μελέτη που έχει ως στόχο την αξιοποίηση της μελάσας, αποβλήτου της βιομηχανίας ζάχαρης και της γλυκερόλης παρέχοντας μια εναλλακτική κατεύθυνση για την παραγωγή μικροβιακού λίπους και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs).

1.3 Η Μελάσα (Ορισμός & Γενικά Χαρακτηριστικά)

Η μελάσα συνιστά παραπροϊόν της διαδικασίας παραγωγής ζάχαρης από ζαχαρότευτλα (Pena *et al.*, 2003). Είναι ένα παχύρευστο σιρόπι και αποτελεί το κύριο παραπροϊόν κατά την παραγωγή της ζάχαρης καθώς περιέχει μεγάλη ποσότητα σακχάρων (50% σάκχαρα επί ξηρού, κυρίως σακχαρόζη και σημαντικές ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης).

Το εν λόγω παραπροϊόν είναι πλούσιο σε οργανική ύλη και χρησιμοποιείται



Εικόνα 2. Η μελάσα, το παχύρευστο υγρό που προκύπτει από το τελικό στάδιο κρυστάλλωσης της ζάχαρης

επικερδώς ως υπόστρωμα σε βιομηχανικές διαδικασίες και στη βιοτεχνολογία. Έτσι, η μελάσα παρουσιάζει υψηλή εμπορική αξία λόγω της χρήσης της ως πηγή άνθρακα σε βιομηχανίες ζύμωσης. Λόγω της περιεκτικότητας σακχάρων που διαθέτει αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα στις ζυμωτικές διεργασίες για την παραγωγή κιτρικού οξέος και πλήθους λοιπών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως αιθανόλης, ζύμης αρτοποιίας, γλουταμινικού οξέος και άλλων καθώς και ζωοτροφών με χαμηλού κόστους. Το χαμηλό κόστος και η

ευρεία διαθεσιμότητα της μελάσας, αποτελούν τα κύρια πλεονεκτήματά της.

Αναλυτικότερα χρησιμοποιείται για (Peters, 2006; Papanikolaou & Sarris, 2016):

- ✓ Παραγωγή αλκοόλης και αλκοολούχων ποτών
- ✓ Παραγωγή ζυμών διατροφής ή ζωοτροφής
- ✓ Ανάκτηση οργανικών οξέων, μαγνησίου, βεταΐνης, κ.α.
- ✓ Παραγωγή με ζύμωση προϊόντων όπως βιοατασενεργά (π.χ. σοφορολιπίδια-τασενεργές γλυκολιπιδικές ενώσεις), βιοϋδρογόνο, βουτανόλη, γλυκερόλη, οργανικά οξέα, βιοπλαστικά (π.χ. ολιγοσακχαρίτες), ενζυμα, κόμμεα, σορβιτόλη, κ.α.
- ✓ Παραγωγή σύνθετων (*composites*) υλικών
- ✓ Παραγωγή υλικών οικοδομής (μονωτικά τούβλα, τσιμέντο κ.α.)

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα της μελάσας είναι

- ❖ η ωριμότητα της ζάχαρης,
- ❖ το ζαχαροκάλαμο ή τα ζαχαρότευτλα από τα οποία προέρχεται,
- ❖ η ποσότητα της ζάχαρης που εξάγεται,
- ❖ η μέθοδος της εξόρυξης που ακολουθείται.

1.4 Σύσταση μελάσας

Πίνακας 1. Σύσταση μελάσας ανάλογα με την πρώτη ύλη από την οποία προέρχεται (Πηγή –Σημειώσεις παραδόσεων, Μπεκατώρου 2014)

Item	Cane	Beet	Citrus
Brix	79.5	79.5	71.0
Total Solids (%)	75.0	77.0	65.0
Specific Gravity	1.41	0.41	1.36
Total Sugars (%)	46.0	48.0	45.0
Crude Protein (%)	3.0	6.0	4.0
Nitrogen Free Extract (%)	63.0	62.0	55.0
Total Fat (%)	0.0	0.0	0.2
Total Fiber (%)	0.0	0.0	0.0
Ash (%)	8.1	8.7	6.0
Calcium, (%)	0.8	0.2	1.3
Phosphorus, (%)	0.08	0.03	0.15
Potassium, (%)	2.4	4.7	0.1
Sodium, (%)	0.2	1.0	0.3
Chlorine, (%)	1.4	0.9	0.07
Sulfur, (%)	0.5	0.5	0.17

Η σύσταση της μελάσας δεν είναι σταθερή αλλά ποικίλει ανάλογα από την πηγή από την οποία προέρχεται (Πίνακας 1). Για παράδειγμα η μελάσα που προέρχεται από ζαχαρότευτλα περιέχει περίπου 50% σάκχαρα επί ξηρού, κυρίως σακχαρόζη και μικρότερα ποσά γλυκόζης, φρουκτόζης και ραφινόζης ενώ η μελάσα σόγιας είναι

πλούσια σε σακχαρόζη, ραφινόζη και σταχυόζη [τετρασακχαρίτης *gal(α1→6) gal(α1→6) glc(β1↔2) fru*].

Επίσης περιέχει βιοτίνη (B₇), ασβέστιο, κάλιο και βεταΐνη και αποτελεί ικανοποιητικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί η σύσταση της μελάσας ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία των ζαχαροκάλαμων, τις αγρο-κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής, τη διαδικασία παρασκευής ζάχαρης και τη διακίνηση και αποθήκευση της (Godbole, 2002). Όμως, σε γενικές γραμμές η μελάσα όντας ένα περίπλοκο προϊόν, περιέχει 45–50% υπολειμματικά σάκχαρα, 15–20% μη σακχαρούχες οργανικές ουσίες, 10–15% τέφρα και περίπου 20% υγρασία, ενώ η ακριβής σύνθεσή της εξαρτάται από το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της ζάχαρης (Victoria *et al.*, 2009). Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται αναλυτικά τα συστατικά της μελάσας που παράγεται από την Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης.

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικές ιδιότητες της μελάσας που παράγεται από ζαχαρότευτλα (πηγή: Διεύθυνση Τεχνικών Υπηρεσιών ΕΛΒΖ, 2013).

Παράμετροι	Τυπικές Τιμές
Brix*	78-80%
Ολικά Σάκχαρα	48 - 52 %
Ιμπερτοσάκχαρο	0,15 - 0,50 %
pH	7,2 - 8,5
Τέφρα	12 - 14 %
Πυκνότητα	1,38 - 1,42 g/cm ³

* Ο βαθμός Brix αποτελεί μία μονάδα μέτρησης των σακχάρων και χρησιμοποιείται κυρίως από την βιομηχανία τροφίμων. Ένας βαθμός Brix ισούται με 1 g σακχαρόζης σε 100gr διαλύματος.

1.5 Παραγωγή μελάσας

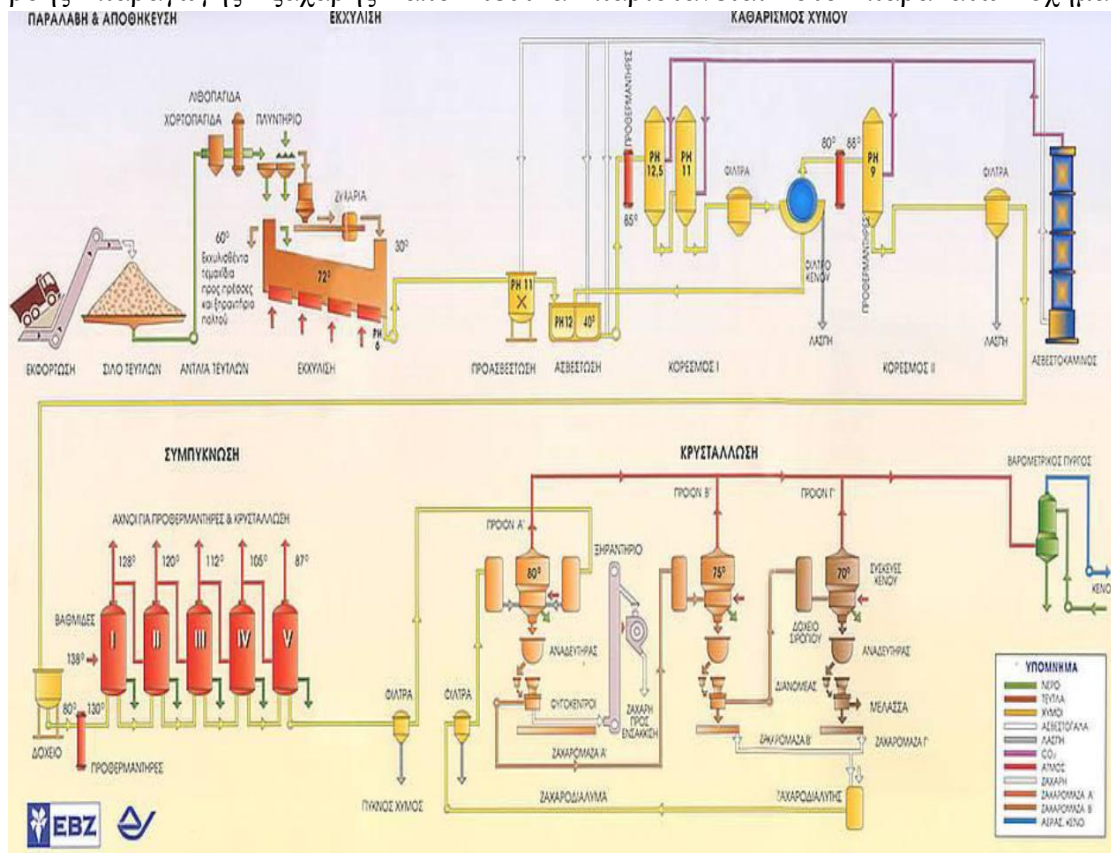
Η μελάσα αποτελεί παραπροϊόν του σταδίου της κρυστάλλωσης κατά τη διάρκεια της πλήρους διαδικασίας παραγωγής της ζάχαρης και είναι παχύρρευστο σκουρόχρωμο σιρόπι. Υπάρχουν τρία είδη μελάσας:

1. η ήπια ή πρώτη μελάσα,
2. το «σκοτάδι» ή δεύτερη μελάσα,
3. η *blackstrap* μελάσα.

Για την παραλαβή της κρυσταλλικής ζάχαρης, τα φυτά ζαχαροκάλαμο ή ζαχαρότευτλο που χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη, συγκομίζονται και αφαιρούνται τα φύλλα τους.

Στη συνέχεια γίνεται θραύση ή πολτοποίησή τους ώστε να εξαχθεί ο χυμός τους που είναι πλούσιος σε σάκχαρα. Ο χυμός αυτός βράζεται για να συγκεντρώσει τα συστατικά που θα οδηγήσουν στην κρυστάλλωση της ζάχαρης. Το αποτέλεσμα του πρώτου βρασμού και της απομάκρυνσης των κρυστάλλων ζάχαρης είναι η *ήπια ή πρώτη μελάσα*, η οποία έχει και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη μελάσας, διότι έχει αφαιρεθεί μικρότερη ποσότητα σακχάρων από το χυμό σε σχέση με τη συνέχεια της διεργασίας.

Η *δεύτερη μελάσα*, το «σκοτάδι» δημιουργείται μετά από δεύτερο βράσιμο και μια δεύτερη εξαγωγή ζάχαρης και έχει μια ελαφρώς πικρή γεύση. Το τρίτο βράσιμο της ζάχαρης δίνει τη *blackstrap μελάσα*. Το μεγαλύτερο ποσοστό της σακχαρόζης από τον αρχικό χυμό έχει αφαιρεθεί και κρυσταλλοποιηθεί αλλά η μαύρη λωρίδα μελάσας εξακολουθεί να περιέχει μια ποσότητα σακχαρόζης. Ένα απλοποιημένο διάγραμμα ροής παραγωγής ζάχαρης από τεύτλα παριστάνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 1. Απλοποιημένο διάγραμμα ροής παραγωγής ζάχαρης από τεύτλα. (Πηγή : http://www.ebz.gr/sugar_production_flow.htm)

1.6 Χαρακτηριστικά και σύσταση αποβλήτων προερχόμενα από επεξεργασία μελάσας

Τα απόβλητα που περιέρχονται από την επεξεργασία της μελάσας παράγονται κυρίως από εργοστάσια ζάχαρης και τις βιομηχανίες ζύμωσης, για παραγωγή αιθανόλης και ζύμης αρτοποιίας. Τα απόβλητα αυτά χαρακτηρίζονται από χαρακτηριστικό σκούρο χρώμα, που οφείλεται κυρίως στην παρουσία μελανοϊδίων, και από υψηλό οργανικό φορτίο. Η «ανθεκτικότητα» των μελανοϊδίων στην αποδόμηση φαίνεται και από το γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές παρά τα διάφορα στάδια επεξεργασίας λυμάτων που επιδέχονται, τελικά καταλήγουν στο περιβάλλον (Mohana *et al.*, 2009). Οι μελανοϊδίνες σε υγρά απόβλητα που εκλύονται από τις βιομηχανίες αυτές μπορούν να προκαλέσουν ρύπανση των υδάτων και έχουν γίνει πολλές έρευνες σχετικά με τον αποχρωματισμό και την διάσπασή τους.

Λόγω της παρουσίας, οργανικών ενώσεων όπως φαινολικών ενώσεων, ινδόλης, και άλλων ενώσεων του θείου οι οποίες δεν αποσυντίθεται από μικροοργανισμούς κατά τη βιολογική επεξεργασία, τα απόβλητα αυτά έχουν δυσάρεστη και έως ανυπόφορη οσμή (Mohana *et al.*, 2009; Pant & Adholeya, 2007).

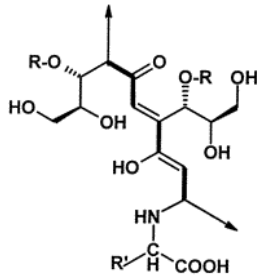
Στη βιβλιογραφία απαντάται σημαντικός αριθμός ερευνών τοξικότητας των αποβλήτων αυτών σε ζωντανούς οργανισμούς υδάτινων οικοσυστημάτων διότι κατά την επεξεργασία της μελάσας παράγονται μεγάλοι όγκοι αποβλήτων (Dahiya *et al.*, 2001). Επιπλέον από τη χρήση της μελάσας ως πρώτη ύλη κυρίως για την παραγωγή προϊόντων ζύμωσης παράγεται ένας μεγάλος όγκος υψηλής φόρτισης λυμάτων (Tondee *et al.*, 2008). Τα εν λόγω λύματα χαρακτηρίζονται από μετρίως όξινο pH (pH 4-5), υψηλή θερμοκρασία, πολύ υψηλή χημική απαίτηση σε οξυγόνο (chemical oxygen demand, COD (65.000 – 13.0000 mg/L) και BOD (40.000-50.000 mg/L), υψηλή συγκέντρωση των μεταλλικών ιόντων, άσχημη οσμή και σκούρο καφέ χρώμα (Zeng, Liu & Qin, 2009). Τα χαρακτηριστικά αυτά διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το είδος της ζύμωσης καθώς εξαρτώνται και από την πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε για τη ζύμωση (Mall *et al.*, 1997)

Η απευθείας διάθεση των αποβλήτων αυτών μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα σε ένα οικοσύστημα. Εκτός των άλλων, η μελάσα περιέχει θρεπτικά στοιχεία, όπως άζωτο (1600-4200 mg/L), φώσφορο (225-3.038 mg/L) και κάλιο (9600-17475 mg/L) που μπορεί να οδηγήσουν σε προβλήματα ευτροφισμού.

Η απευθείας απόρριψη των συγκεκριμένων αποβλήτων στο έδαφος είναι εξίσου επικίνδυνη εξαιτίας της μείωσης της εδαφικής αλκαλικότητας και της διάθεσης του μαγγανίου που παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπόρων (Dahiya *et al.*, 2001; Kumar & Chandra, 2006).

Το χρώμα του αποβλήτου δύσκολα μπορεί να απομακρυνθεί με συμβατικές μεθόδους απορρύπανσης ενώ μπορεί ακόμη και να αυξηθεί κατά τη διάρκεια της αναερόβιας επεξεργασίας, λόγω επαναπολυμερισμού των ενώσεων που περιέχει. Οι φαινόλες (τανίνες και χουμικά οξέα) από τις πρώτες ύλες, τα προϊόντα καραμελοποίησης των σακχάρων (Godshall, 1999), η φουρφουράλη και κυρίως οι μελανοϊδίνες από την αντίδραση Maillard των σακχάρων, αποτελούν ενώσεις που συμβάλουν στο χρώμα της εκροής (Kort, 1979). Επιπλέον, το σκούρο χρώμα μειώνει την ικανότητα των οργανισμών για φωτοσύνθεση, εμποδίζοντας τη διέλευση του ηλιακού φωτός, με αποτέλεσμα να προκαλεί σοβαρές βλάβες στην υδρόβια ζωή (FitzGibbon *et al.*, 1998). Το σκούρο καφέ χρώμα είναι το αποτέλεσμα της μη

ενζυματικής αντίδρασης αμαύρωσης, γνωστής και ως αντίδραση Maillard, που λαμβάνει χώρα λόγω της δράσης των αμινοξέων επί των αναγόντων σακχάρων. Τελικό προϊόν της αντίδρασης είναι οι μελανοΐδινες, που θεωρούνται περιβαλλοντικοί ρύποι (Kumar & Chandra, 2006).



R: H, glc, (glc)_n

Εικόνα 3. Προτεινόμενη γενική δομή πολυμερούς μελανοΐδινης (Cämmerer et al., 2002). R: H ή σακχαρίτες R': πλευρική αλυσίδα αμινοξέος.

που επιδέχονται, τελικά καταλήγουν στο περιβάλλον (Mohana *et al.*, 2009). Οι μελανοΐδινες σε υγρά απόβλητα που εκλύονται από τις βιομηχανίες αυτές μπορούν να προκαλέσουν ρύπανση των υδάτων και έχουν γίνει πολλές έρευνες σχετικά με τον αποχρωματισμό και την διάσπασή τους.

Η αντίδραση Maillard είναι μια χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα μεταξύ των καρβονυλομάδων των αναγωγικών σακχάρων και των αμινομάδων των αμινοξέων, των πεπτιδίων, ή των πρωτεϊνών (Wang *et al.*, 2011). Οι φυσικές μελανοΐδινες βρίσκονται στα τρόφιμα (Painter *et al.*, 1998), στα ποτά και σε μεγάλο βαθμό σε διάφορα αγρο-βιομηχανικά προϊόντα όπως η μελάσα (Kumar & Chandra, 2006). Η δομή των μελανοΐδινών δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή αλλά θεωρείται πως δεν έχει μια καθορισμένη δομή, καθώς η στοιχειακή της δομή και η χημική της σύσταση εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση και τη μοριακή συγκέντρωση των αντιδρώντων. Επιπλέον, εξαρτάται και από τις συνθήκες της αντίδρασης όπως το pH, τη θερμοκρασία, το χρόνο θέρμανσης και το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιείται (Yaylayan & Kaminsky, 1998).

Οι μελανοΐδινες που βρίσκονται στα τρόφιμα, όπως σε προϊόντα αρτοποιίας, στον καφέ και στην μπύρα που έχουν καφέ χρώμα, προσδίδουν αντιοξειδωτικές, αντιαλλεργικές, αντιμικροβιακές και κυτταροτοξικές ιδιότητες που βοηθούν στην υγεία του ανθρώπου καθώς δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες και ως χηλικές ενώσεις. Παρόλα αυτά, οι μελανοΐδινες μπορεί να είναι μεταλλαξιογόνες, καρκινογόνες και κυτταροτοξικές, κάτι που είναι επιβλαβές για την ανθρώπινη υγεία (Silvan *et al.*, 2006).

Τα απόβλητα με υψηλό ποσοστό μελανοΐδινών που προέρχονται από τις διάφορες βιομηχανίες, αποτελούν τη κύρια πηγή ρύπανσης του εδάφους και των υδάτινων πόρων

(Evershed *et al.*, 1997), καθώς είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στη μικροβιακή προσβολή και στις συμβατικές βιολογικές διεργασίες. Ως εκ τούτου, τα λύματα αυτά απαιτούν μια προεπεξεργασία, πριν απορριφθούν στο περιβάλλον (Mohana *et al.*, 2007; Kumar & Chandra, 2006).

Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί ότι το κύριο υγρό απόβλητο της βιομηχανίας αποσταγμάτων που προκύπτει από ζύμωση μελάσας είναι η βινάσσα. Πρόκειται για

ένα όξινο απόβλητο με μεγάλο οργανικό φορτίο πλούσιο σε οξέα, υδατάνθρακες, φαινόλες, και ενώσεις με Πίνακας 3. Σύσταση βινάσας από διαφορετικές πρώτες ύλες .Πηγή- Μπεκατώρου, σημειώσεις παραδόσεων 2014.

	Sugar source					
	Cane juice	Cane molasses	Grapes (wine)	Agave (tequila)	Sweet sorghum	Beet molasses
BOD [g L ⁻¹]	16.7	39.5	14.54-16.3	20.6	46	27.5-44.9
COD [g L ⁻¹]	30.4	84.9-95	26-50.2	55.2-66.3	79.9	55.5-91.1
N _T [mg L ⁻¹]	102-628	153-1230	104.9-650	na	800	1800-4750
P _T [mg L ⁻¹]	71-130	1-190	65-118.4	41	1990	160-163
K [mg L ⁻¹]	1733-1952	4893-11000	118-800	240-345	na	10000-10030
S _T [mg L ⁻¹]	1356	1500-3480	120	780-880	na	3500-3720
pH	4.04-4.6	4.46-4.8	3-4.2	3.4	4.5	4.3-5.35
Cu [mg L ⁻¹]	4	0.27-1.71	0.2-3.26	0.36-4	37	2.1-5*
Cd [mg L ⁻¹]	na	0.04-1.36	0.05-0.08	0.01-0.2	na	<1*
Pb [mg L ⁻¹]	na	0.02-0.48	0.55-1.34	0.065-0.5	na	<5*
Fe [mg L ⁻¹]	16	12.8-157.5	0.001-0.077	35.2-45	317	203-226*
Phenols [mg L ⁻¹]	na	34	29-474	44-81	na	450*
W(L _{ethanol})	13	12-20	11.6	10-12	14.3-16	9-15
Reference	1	2	3	4	5	6

N_T, total nitrogen; P_T, total phosphorus; S_T, total sulfate; W, vinasse yield; na, data not available.
*Unit is mg kg⁻¹.

μεγάλη ποσότητα COD και BOD, καθώς και σε στερεά συστατικά) όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 3. Για τον συγκεκριμένο λόγο η απόρριψη της στον υδροφόρο ορίζοντα προκαλεί τοξική ρύπανση και άλλα σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα. Για μείωση του οργανικού φορτίου της, διάφορες φυσικοχημικές

μέθοδοι και αερόβια βιολογική κατεργασία έχουν μελετηθεί με κύριο απαγορευτικό παράγοντα εφαρμογής το υψηλό κόστος. Εναλλακτικά, μελετώνται βιοτεχνολογικές μέθοδοι (π.χ. χρήση ως θρεπτικό μέσο σε διεργασίες ζυμώνσεων) για κατεργασία και παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας.

1.7 Μέθοδοι αποικοδόμησης και βιο-αποικοδόμησης μελανοϊδινών.

Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει τη χημική και μικροβιακή αποικοδόμηση και τον αποχρωματισμό των φυσικών και συνθετικών μελανοϊδινών στις μελάσες από ζαχαροκάλαμο, όμως δεν υπάρχει μια σαφής ερμηνεία σχετικά με το μηχανισμό αποικοδόμησης τους (Metsoviti *et al.*, 2011). Αυτό οφείλεται κυρίως στην πολυπλοκότητα των αντιδράσεων Maillard και στη μη καθορισμένη δομή των μελανοϊδινών .

Η συνήθης πρακτική κατά την επεξεργασία αποβλήτων μεγάλης περιεκτικότητας σε μελάσα, είναι η βιολογική επεξεργασία. Αυτή περιλαμβάνει συνδυασμό αναερόβιας χώνευσης και αερόβιου σταδίου και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του βιοαποδομήσιμου κλάσματος των οργανικών ουσιών. Ωστόσο, η παρουσία χρωστικών όπως οι μελανοϊδίνες, προκαλεί τη διατήρηση ή ακόμα και την αύξηση του χρώματος στις επεξεργασμένες εκροές. Ως συνέπεια, σήμερα καταβάλλονται αρκετές προσπάθειες για την ανάπτυξη κατάλληλων προχωρημένων τεχνικών για την αποτελεσματική απομάκρυνση των ουσιών αυτών.

Διάφορες φυσικοχημικές διεργασίες έχουν εφαρμοστεί για τον αποχρωματισμό αποβλήτων από την επεξεργασία της μελάσας, όπως η προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα, η χημική οξειδωση με υποχλωριώδη άλατα και υπεροξειδίου του υδρογόνου, η υπερδιήθηση και η νανοδιήθηση μέσω μεμβρανών κλπ. Ωστόσο, οι τεχνικές αυτές παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα, όπως ασταθή ικανότητα αποχρωματισμού των αποβλήτων, πιθανό σχηματισμό επικίνδυνων παραπροϊόντων και δευτερογενών ρύπων, δυσκολίες στη λειτουργικότητά τους και ιδιαίτερα υψηλό κόστος, που είχε ως συνέπεια την περιορισμένη εφαρμογή τους για την επεξεργασία των εκροών.

Η επεξεργασία του αποβλήτου με φυσικές ή χημικές μεθόδους κρίνεται ακατάλληλη λόγω του υψηλού κόστους εφαρμογής σε μεγάλη κλίμακα, ενώ ιδιαίτερα δύσκολη θεωρείται και η μεταχείριση με τις συνήθεις βιολογικές διεργασίες όπως η ενεργοποιημένη ιλύς (Singh & Nigam, 1995). Ως συνέπεια, απαιτούνται απλές τεχνικές με μικρό κόστος για την αποτελεσματική επεξεργασία των βιολογικά επεξεργασμένων εκροών.

Οι μικροοργανισμοί (βακτήρια / μύκητες / ζύμες) λόγω της έμφυτης ικανότητας τους να μεταβολίζουν ποικίλες ενώσεις, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη βιο-αποικοδόμηση πολύπλοκων, τοξικών και ανθεκτικών ενώσεων, που βρίσκονται σε βιομηχανικά απόβλητα για την περιβαλλοντική ασφάλεια. Η μικροβιακή αποικοδόμηση και ο αποχρωματισμός των βιομηχανικών αποβλήτων είναι μια φιλική προς το περιβάλλον και οικονομικά ανταγωνιστική εναλλακτική λύση στη χημική διαδικασία της αποσύνθεσης των αποβλήτων (Mohana *et al.*, 2007; Pant & Adholeya, 2007).

Μέσω της μικροβιακής αποικοδόμησης η μελάσα χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων με ταυτόχρονη επίτευξη αποχρωματισμού της. Τα τελευταία χρόνια, αρκετοί Βασιδιομύκητες και Ασκομύκητες έχουν χρησιμοποιηθεί για τον αποχρωματισμό τόσο των φυσικών όσο και των συνθετικών μελανοϊδινών (Miranda *et al.*, 1996).

Η βιολογική αποικοδόμηση των μελανοϊδινών εξαρτάται από

- ✓ το pH,
- ✓ τη θερμοκρασία,
- ✓ τη συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών στο υπόστρωμα ,
- ✓ τη συγκέντρωση του οξυγόνου ,
- ✓ το μέγεθος του εμβολίου,
- ✓ τον μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται στην εκάστοτε βιομετατροπή.

Το ενζυμικό σύστημα του μικροοργανισμού που είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση των μελανοϊδινών περιλαμβάνει κυρίως οξειδάσες και υπεροξειδάσες, όπως η οξειδάση της γλυκόζης, οι εξαρτώμενες και μη μαγγανικές υπεροξειδάσες (MnP και MIP αντίστοιχα) οι οποίες έχουν την ικανότητα παρουσία H_2O_2 , να αποχρωματίζουν τις μελανοϊδίνες.

1.8 Παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων με υπόστρωμα τη μελάσα.

Η μελάσα λόγω του μηδενικού κόστους παραγωγής της και της μεγάλης διαθεσιμότητας της χαρακτηρίζεται ως ένα από α χαμηλού κόστους υποστρώματα που προέρχονται από τα γεωργικά υπολείμματα και θεωρείται κατάλληλη για μικροβιακές ζυμώσεις αφού αποτελεί πηγή άνθρακα λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σακχάρων της.

Ήδη υπάρχει πλήθος μελετών που έχουν δημοσιευθεί και αναφέρονται στα προϊόντα που προκύπτουν από την βιομετατροπή του εν λόγω υποστρώματος με την χρήση μη παθογόνων μικροοργανισμών. Μερικά από τα προϊόντα αυτά είναι

- ✓ Το ενδοκυτταρικό λίπος (SCO). Είναι το μεταβολικό προϊόν που παράγεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης με υπόστρωμα μελάσας έχοντας ως περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο (Ratledge *et al.*, 2011).

- ✓ Το *κιτρικό οξύ* είναι ένα άλλο βιοτεχνολογικό προϊόν και παράγεται κατά κύριο λόγο από το μύκητα *Aspergillus niger*, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη μελάσα, (Paranikolaou & Aggelis, 2009).
- ✓ Η *αιθανόλη*. Υπάρχει μεγάλος αριθμός μελετών για την παραγωγή αιθανόλης με υπόστρωμα τη μελάσα τόσο από τα ζαχαρότευτλα όσο και από το ζαχαροκάλαμο με τη χρήση του βακτηρίου *Zymomonas mobilis* και της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, (Sarris, 2014; Kopsahelis, 2012).
- ✓ *Ερυθρομυκίνη*, πρόκειται για δευτερογενή μεταβολίτη που προκύπτει με τη δράση του ακτινομύκητα *Saccharopolyspora erythraea* σε υπόστρωμα με βάση τη μελάσα, (El-Enshay *et al.*, 2008).
- ✓ Το *γλυκονικό οξύ*. Η παραγωγή του σε υπόστρωμα μελάσας, πραγματοποιείται με ζύμωση με την χρήση γενετικά τροποποιημένων στελεχών του μύκητα *Aspergillus niger*.
- ✓ *Ηλεκτρικό οξύ* από το βακτήριο *Actinobacillus succinogenes*. Το ηλεκτρικό οξύ παράγεται από διάφορα μεταβολικά μονοπάτια τόσο αερόβιων όσο και δυνητικά αερόβιων οργανισμών και αποτελεί πρόδρομο ουσία για πληθώρα προϊόντων, που περιλαμβάνουν εμπορικά, χημικά, φαρμακευτικά, πρόσθετα τροφών, διαλύτες και βιοαποικοδομίστμα πλαστικά (Willke & Vorlop, 2004).

1.9 Η Γλυκερόλη.

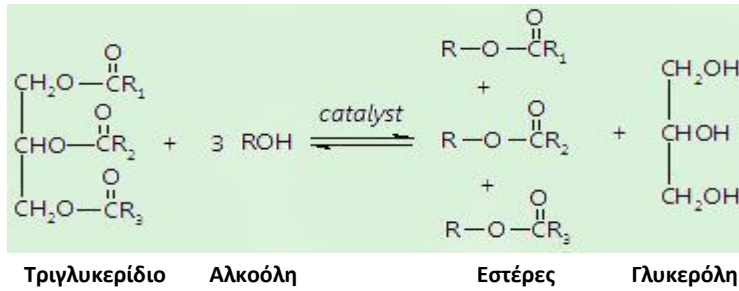
Η γλυκερόλη είναι προϊόν χαμηλού ή μηδενικού κόστους επιδεκτικό για περαιτέρω αξιοποίηση, (Paranikolaou & Aggelis, 2009). Γενικά η γλυκερόλη παράγεται από:

- Βιομηχανίες παραγωγής αιθανόλης και αλκοολούχων ποτών (thin stillage).
- Βιομηχανίες παραγωγής βιοντίζελ.
- Βιομηχανίες παραγωγής σαπώνων και ελαιοχημικών υλικών.
- Λόγω ενδοκυτταρικής αποθήκευσης μέχρι 85% κ.β σε στελέχη φυκών.

Ουσιαστικά πρόκειται για μια τρισθενής αλκοόλη η οποία απαντάται στη φύση σε όλα τα ζωικά και φυτικά λίπη στη μορφή γλυκεριδίων. Όταν αυτά τα λίπη υποστούν μετεστεροποίηση με την προσθήκη αλκοόλης (συνήθως μεθανόλη) για τον σχηματισμό βιοντίζελ, η γλυκερόλη ανακτάται στην αρχική της μορφή ως παραπροϊόν της αντίδρασης.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται παγκοσμίως μια αλματώδη αύξηση στην σύνθεση βιοντίζελ. Στην Ευρώπη για παράδειγμα, η ετήσια παραγωγή του συγκεκριμένου βιοκαυσίμου, από 1.065.000 τόνους το 2002 ανήλθε στους 3.184.000 τόνους το 2005 και στους 6.069.000 τόνους το 2006. Αποτέλεσμα αυτής της αύξησης είναι να συσσωρεύονται σημαντικές ποσότητες γλυκερόλης που όπως αναφέρθηκε είναι το κύριο παραπροϊόν της παραγωγής βιοντίζελ.

Η διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ από φυτικά και ζωικά λίπη που εφαρμόζεται παγκόσμια σε βιομηχανικό επίπεδο συνίσταται στην παραγωγή λιπαρών εστέρων (αιθυλεστέρων ή μεθυλεστέρων) από τριγλυκερίδια και αιθανόλη ή μεθανόλη, αντίδραση που πραγματοποιείται σε αλκαλικό περιβάλλον. Η γλυκερόλη αποτελεί το 10% v/v του παραγόμενου εστέρα (Paranikolaou *et al.*, 2004; Mu *et al.*, 2006).



Εικόνα 4. Αντίδραση μεθυλεστεροποίησης τριγλυκεριδίου.

Υπολογίζεται ότι κάθε 10 kg βιοκαυσίμου που παράγεται δημιουργείται 1 kg καθαρής γλυκερόλης ως υποπροϊόν της διεργασίας. Η καθνή γλυκερόλη έχει μεγάλο εύρος εφαρμογών στις βιομηχανίες τροφίμων,

φαρμακευτικών, συνθετικών και καλλυντικών. Γι' αυτό το λόγο η γλυκερόλη που παράγεται στις μονάδες σύνθεσης βιοντίζελ καθαρίζεται και διοχετεύεται στις διάφορες αυτές εφαρμογές.

Οι μεγάλες ποσότητες γλυκερόλης που παράγονται ως υποπροϊόν της βιομηχανίας βιοντίζελ έχουν ωθήσει στην κατάρρευση της τιμής της γλυκερόλης (Deckwer, 1995; Dharmadi *et al.*, 2006), ενώ οι βιομηχανίες παραγωγής βιοντίζελ αντιμετωπίζουν προβλήματα διαχείρισής της (Willke & Vorlop, 2004; Dharmadi *et al.*, 2006). Ενδεικτικά το 2007 όταν η παραγωγή της γλυκερόλης έφτασε τους 6.000.000 τόνους η ακάθαρτη γλυκερόλη θεωρήθηκε ως τυπικό βιομηχανικό απόβλητο, (Paranikolaou & Aggelis, 2009). Για τους λόγους αυτούς η αξιοποίηση της γλυκερόλης ως πηγής άνθρακα για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω χημικών ή μικροβιακών διεργασιών είναι πολύ σημαντική, και, εκτός των άλλων, θα βελτιώσει την ανταγωνιστικότητα του βιοντίζελ έναντι των ορυκτών καυσίμων.

Η γλυκερόλη μπορεί να παραχθεί μέσω μικροβιακών ζυμώσεων, με χημική σύνθεση από πρώτες ύλες της βιομηχανίας πετρελαίου ή ως υποπροϊόν της βιομηχανίας σάπωνος. Στην τελευταία περίπτωση, η γλυκερόλη παράγεται ως παραπροϊόν κατά την υδρόλυση (σαπωνοποίηση) των λιπών. Αυτή βέβαια η διαδικασία τείνει να εκλείψει, δεδομένου ότι οι σάπωνες τείνουν να αντικατασταθούν από άλλα απορρυπαντικά (Wang *et al.*, 2001; da Silva *et al.*, 2009).

Στην Ευρώπη, για την παραγωγή βιοντίζελ χρησιμοποιείται κυρίως έλαιο ελαιοκράμβης, ενώ σε άλλες περιοχές όπως η Βραζιλία έλαια από σόγια, ηλιάνθο, κ.ά.. Εναλλακτικά, ως πρώτη ύλη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν διάφορες λιπαρές ύλες μηδαμινού ή πολύ χαμηλού κόστους, όπως τα τηγανισμένα έλαια (Yuste & Dorado, 2006).

Σήμερα η γλυκερόλη χρησιμοποιείται σε πολλές εφαρμογές όπως στα καλλυντικά, τις βαφές, την αυτοκινητοβιομηχανία, τα τρόφιμα, τον καπνό, τη φαρμακοβιομηχανία, τις βιομηχανίες υφασμάτων και δερμάτων. Χρησιμοποιείται, επίσης, ως πρώτη ύλη για την παραγωγή διαφόρων χημικών. Επιπροσθέτως, η χρήση της γλυκερόλης ως πρώτης ύλης σε βιομηχανικές ζυμώσεις παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον (Wang *et al.*, 2001). Επομένως παρκετά υποσχόμενη εφαρμογή είναι η βιομετατροπή της γλυκερόλης σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω μικροβιακών ζυμώσεων.

Η γλυκερόλη δεν είναι μόνη φτηνή και διαθέσιμη σε μεγάλες ποσότητες, αλλά επιπλέον, ο μεγάλος βαθμός αναγωγής της την καθιστά αποδοτικότερο υπόστρωμα παραγωγής προϊόντων όπως η αιθανόλη, η ξυλιτόλη, το υδρογόνο κτλ. σε σύγκριση με τα σάκχαρα. Αναλυτικότερα, η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα στις μικροβιακές ζυμώσεις προς παραγωγή:

- Βιοαερίου,
- Χρωστικών,
- Οργανικών οξέων,
- Μικροβιακής μάζας,
- Πολυολών,
- Μικροβιακού λίπους,
- Βιοπλαστικών

Ακόμη δύναται να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την βιομετατροπή με χρήση βακτηρίων προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης και πιθανόν 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης.

1.10 Διάμεσος μεταβολισμός της γλυκόζης και της γλυκερόλης στο μικροβιακό κύτταρο.

Σύμφωνα με την καταβολική οδό EMP (*Embden- Meyerh of-Parnas*) η οποία χρησιμοποιείται από τους ευκαριωτικούς μικροοργανισμούς και από κάποια βακτήρια η γλυκόζη και η φρουκτόζη μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ χωρίς απώλειες άνθρακα. Το γλυκολιτικό σχήμα συνεισφέρει ενεργειακά στο μικροβιακό κύτταρο με την απόδοση δύο ανηγμένων συνενζύμων NADH και την αναγέννηση δύο μορίων ATP. Από ένα μόριο γλυκόζης παράγονται 2 μόρια πυροσταφυλικού οξέος μεγάλης βιολογικής σημασίας αφού το πυρουβικό οξύ τη βιοσυνθετική κεφαλή πολλών αναβολικών προδρόμων. Η συνολική αντίδραση του γλυκολυτικού σχήματος EMP, (Bellou *et al.*, 2016) έχει ως εξής (*αντίδραση 1*):

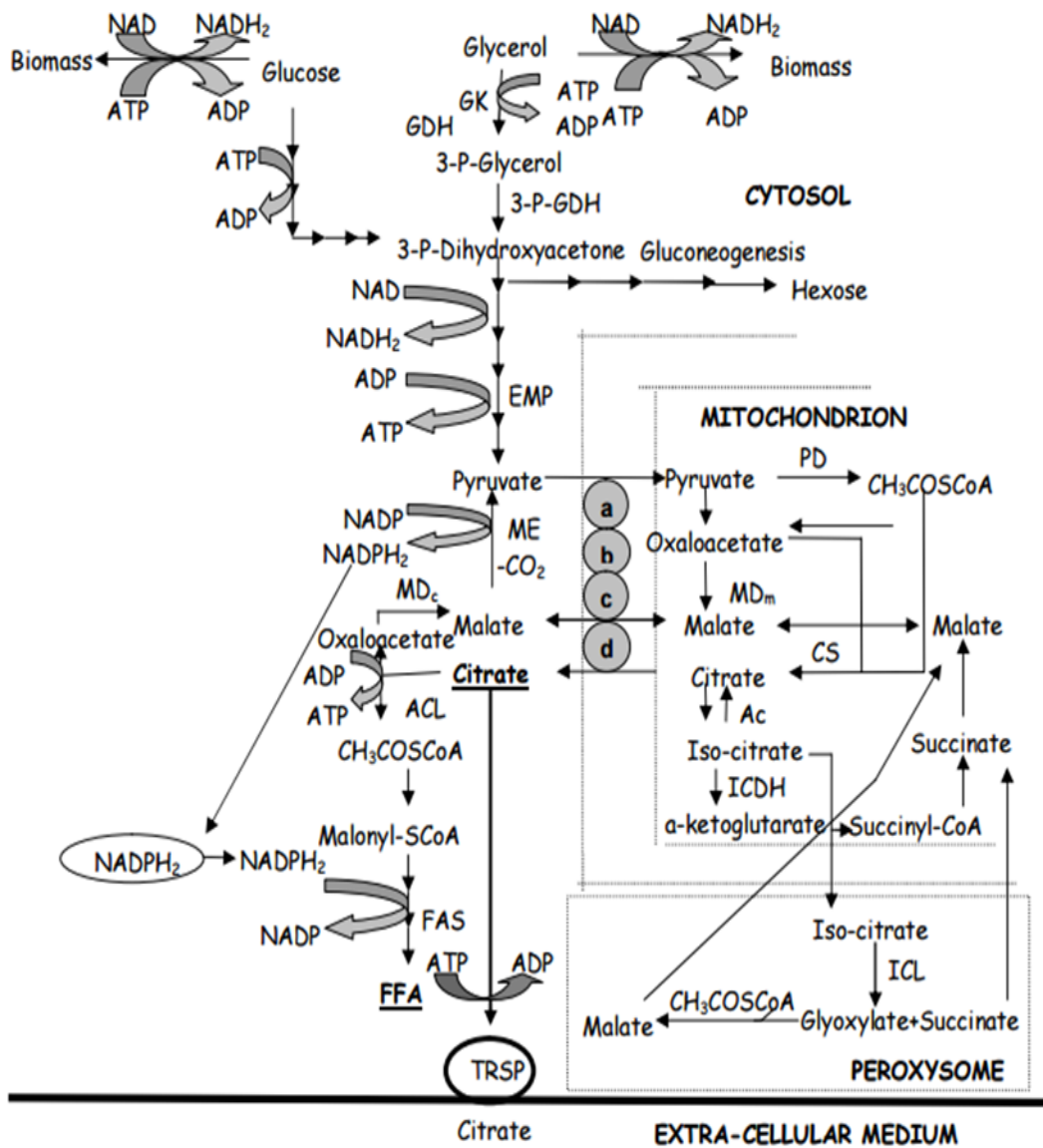


Σε μύκητες, ζύμες και σε αερόβια βακτήρια πραγματοποιείται ο αερόβιος μεταβολισμός της γλυκερόλης. Στις περισσότερες περιπτώσεις η είσοδος της γλυκερόλης στο μικροβιακό κύτταρο γίνεται με διευκολυνόμενη διάχυση κατά την οποία η πρωτεΐνη φορέας που εδράζει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη προσδένεται στο μόριο και το μεταφέρει χωρίς όμως τι τελευταίο να υφίσταται φωσφορυλίωση επομένως δεν υπάρχει κατανάλωση ενέργειας.

Εάν ο μικροοργανισμός δεν μπορεί να τελέσει την γλυκόλυση EMP δεν μπορεί να καταναλώσει την γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα. Οποιοδήποτε και από τα τρία καταβολικά μονοπάτια της γλυκερόλης λαμβάνει χώρα στο τέλος υπάρχει σχηματισμός ενός ενδιάμεσου του C3 μονοπατιού της γλυκόλυσης EMP. Ακόμη από κάθε μόριο καταβολιζόμενης γλυκερόλης παράγεται ένα μόριο πυρουβικού οξέος, 2 αναγωγικά συνένζυμα NADH που θα ανακυκλωθούν είτε μέσω της βιοσύνθεσης υλικών είτε μέσω της αναπνοής και ένα μόριο ATP. Η συνολική αντίδραση του αερόβιου μεταβολισμού της γλυκερόλης, (Fakas *et al.*, 2009) έχει ως εξής:



Συνοψίζοντας στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται αναλυτικά ο διάμεσος μεταβολισμός της γλυκόζης και της γλυκερόλης προς παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους - Single Cell Oil (SCO). Τόσο η γλυκόζη όσο και η γλυκερόλη, ύστερα από μετατροπή της σε 3-P- γλυκερόλη μέσω του ενζύμου κινάση της γλυκερόλης (GK), μετατρέπονται σε 3-P- διυδροξυακετόνη . Στη συνέχεια μέσω της καταβολικής οδού EMP μεταβολίζονται σε πυρουβικό οξύ το οποίο από το κυτταρόπλασμα μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο και συμβάλλει σημαντικά στην βιοσύνθεση λιπιδίων , διαδικασία που θα αναλυθεί στο επόμενο κεφάλαιο της παρούσας μελέτης.



Σχήμα 2 . Διάμεσος μεταβολισμός της γλυκόζης και της γλυκερόλης προς παραγωγή κηττικού οξέος και/ή μικροβιακού λίπους.(Πηγή – Papanikolaou & Aggelis, 2011 -προσαρμοσμένο)

1.11 Βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον των ελαιογόνων μικροοργανισμών.

Ως ελαιογόνοι (oleaginous) χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα σε κάποια στιγμή του αυξητικού τους κύκλου και όταν οι συνθήκες αύξησης το επιτρέψουν να συσσωρεύουν μικροβιακά λιπίδια σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% w/w επί της ξηρής τους βιομάζας. Το ποσοστό των λιπιδίων των εν λόγω μικροοργανισμών δύναται να ανέλθει μέχρι 80% w/w επί της ξηρής τους βιομάζας (Paranikolaou & Aggelis, 2011).

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι κυρίως ζύμες και μύκητες αλλά και βακτήρια, καθώς και αυτότροφα φωτοσυνθέτοντα μικροφύκη. Οι ζύμες ήταν οι πρώτοι μικροοργανισμοί που αναγνωρίστηκαν ικανοί για την συσσώρευση μικροβιακού λίπους (Paranikolaou & Aggelis, 2011). Υπάρχουν αναφορές ότι τουλάχιστον 25 διαφορετικά είδη ζυμών μπορούν να συσσωρεύσουν λίπος εντός των κυττάρων τους σε ποσοστά μεγαλύτερα από το 20% w/w επί της ξηράς τους ουσίας σε αντίθεση με τους μύκητες των οποίων λιγότερα από 50 είδη μπορούν να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος πάνω από το 25% w/w επί της ξηράς τους ουσίας (Ratledge, 1989).

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, έχουν σημαντικό βιομηχανικό και οικολογικό ενδιαφέρον λόγω της ικανότητας τους να βιομετατρέπουν διάφορα γεωργο-βιομηχανικά απόβλητα και παρα- ή υπο- προϊόντα με χαμηλό ή/ και μηδενικό κόστος σε μικροβιακό λίπος, που μπορούν να αξιοποιηθούν είτε στην παραγωγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Polyunsaturated Fatty acids, PUFAs) ή στην παραγωγή βιοντίζελ (Fakas *et al.*, 2008; Bellou *et al.*, 2013; 2016).

Το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον των ελαιογόνων μικροοργανισμών έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια διότι τα μικροβιακά λιπίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ, εναλλακτικά των φυτικών ελαίων και ζωικών λιπών (Fakas *et al.*, 2008).

Η συνεχής απαίτηση για την παραγωγή λιπιδίων υψηλής διατροφικής και θεραπευτικής αξίας έστρεψε το ενδιαφέρον σε ελαιογόνους μύκητες, όπως εκείνους της κλάσης των Ζυγομυκήτων, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να παράγουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Οι εν λόγω μύκητες μπορεί να είναι οικονομικά ωφέλιμοι μιας και το κυρίαρχο κλάσμα των μικροβιακών λιπιδίων συνίσταται από τριγλυκερίδια (Certik & Shimizu, 1999).

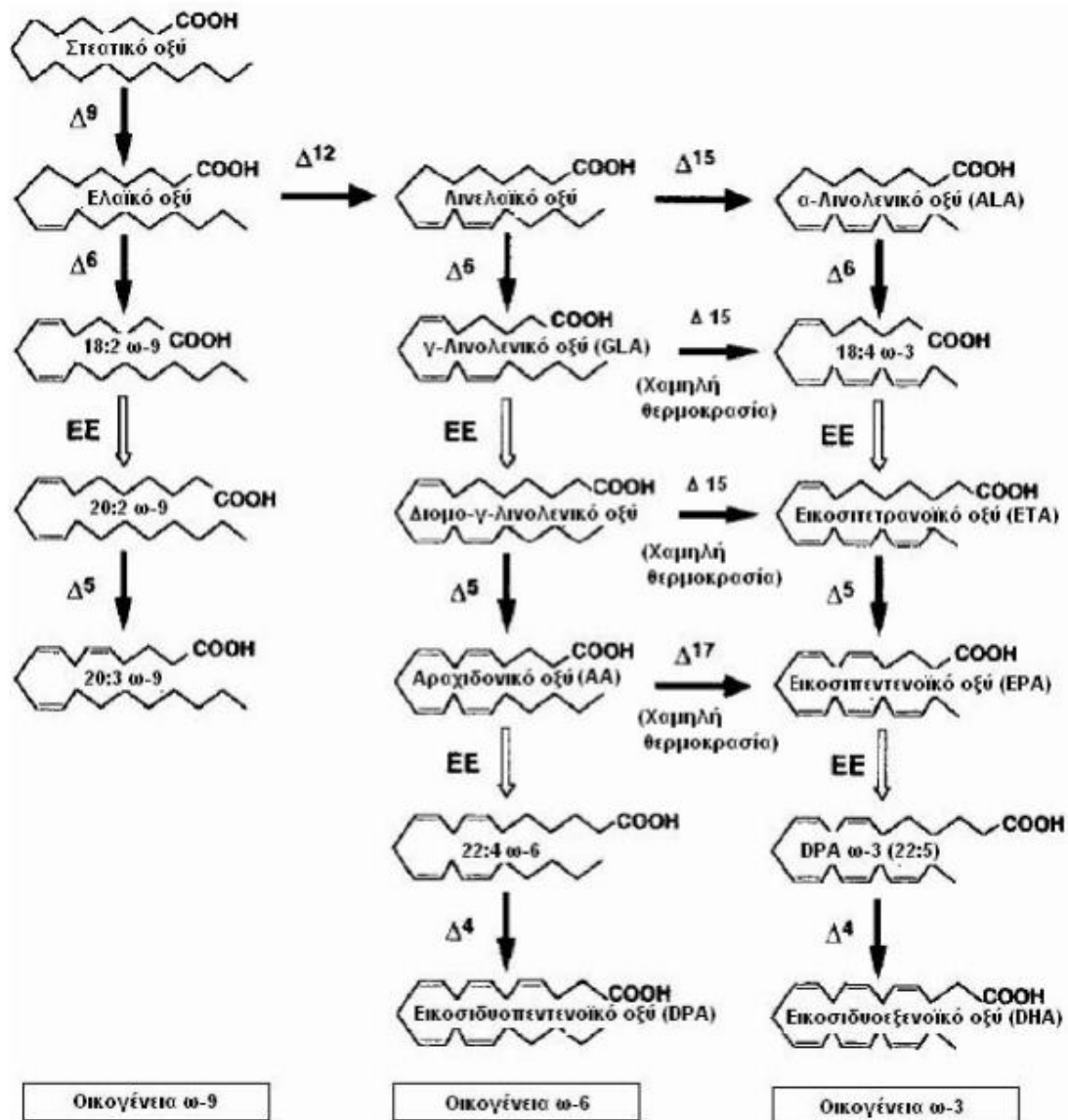
Τα μικροβιακά έλαια δεν είναι ανταγωνιστικά σε οικονομικό επίπεδο των συμβατικών φυτικών ή ζωικών λιπών (Koutinas *et al.*, 2014). Ωστόσο, η παραγωγή του μικροβιακού λίπους είναι εξαιρετικά δαπανηρή διεργασία, κυρίως λόγω του ενεργειακού κόστους που απαιτείται κατά την αποστείρωση, του κόστους των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών και των υποδομών που χρειάζονται ώστε να επιτευχθεί παραγωγή μεγάλη κλίμακα.

Συνοψίζοντας, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί αποτελούν σημαντικό εργαλείο στα χέρια των επιστημόνων καθιστώντας εφικτή την παραγωγή, μέσω βιομετατροπής ή ζυμωτικών διεργασιών, προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Για το λόγο αυτό, το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την αξιοποίηση βιομηχανικών αποβλήτων ως υποστρωμάτων για την καλλιέργεια αυτών των μικροοργανισμών.

1.12 Σημασία και βιοσύνθεση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs).

Βασική μονάδα των λιπιδίων είναι τα λιπαρά οξέα τα οποία είναι οργανικά οξέα μακράς ανθρακικής αλυσίδας. Τα λιπαρά οξέα που φέρουν δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς καλούνται πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty acids, PUFAs). Επομένως τα μικροβιακά λιπίδια αποτελούν τις κύριες πηγές των PUFAs, τα οποία έχουν ιδιαίτερο φαρμακευτικό και διατροφικό ενδιαφέρον (Čertik & Shimizu, 1999).

Ανάλογα με την θέση του πρώτου διπλού δεσμού του μεθυλικού άκρου της ανθρακικής αλυσίδας, τα PUFAs διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες (ω -3, ω -6, ω -7 και ω -9). Από αυτές τις κατηγορίες οι ω -3 και η ω -6 περιλαμβάνουν λιπαρά οξέα τα οποία δεν μπορούν να συντεθούν *de novo* από τον ανθρώπινο οργανισμό και καλούνται απαραίτητα λιπαρά οξέα (Essential Fatty Acids–EFAs). Η βιοσύνθεση των ω -3, ω -6 και ω -9 ομάδων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 2).



Σχήμα 3. Βιοσυνθετική οδός *de novo* γένεσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Polyunsaturated Fatty acids, PUFAs) Πηγή- (Certik & Shimizu, 1999)

Πρόδρομη ένωση για τον σχηματισμό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αποτελεί το στεατικό οξύ το οποίο έπειτα από τη δράση της Δ6 αποκορεσμάσης μετατρέπεται σε ελαιικό οξύ (Σχήμα 2). Τα πρώτα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται σε όλους σχεδόν τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και σε ορισμένα βακτήρια είναι το παλμιτικό (C16:0) και το στεατικό οξύ (C18:0). Αυτά είναι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, από τα οποία προκύπτουν τα διάφορα κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας, μέσω της δράσης των αποκορεσμάσεων (desaturases) και ελονγκασών (elongases).

Τα PUFAs της ω-9 οικογένειας συντίθεται από ελαιικό οξύ και έπειτα από την δράση της Δ6 αποκορεσμάσης, ακολουθεί επιμήκυνση και δράση της Δ5 αποκορεσμάσης για να σχηματιστεί τελικά εικοσατριενοϊκό οξύ (Δ9,12,15C20:3) (Σχήμα 3).

Τα PUFAs της ω-6 οικογένειας συνήθως συντίθενται από το λινελαϊκό οξύ μέσω αποκορεσμάσεων (Δ6, Δ5, Δ4) και επιμήκυνσης της αλειφατικής αλυσίδας από το λινελαϊκό, στο GLA, στη συνέχεια στο αραχιδονικό, στο εικοσιδυοτετρανοϊκό οξύ (Δ7,10,16,16C22:4) και τελικά στο DPA-ω-6 (Σχήμα 3).

Σχετικά με τη βιοσύνθετική οδό των ω-3 PUFAs στους μικροοργανισμούς υπάρχουν δυο εναλλακτικές οδοί. Στην πρώτη περίπτωση, στην οποία η βιοσυνθετική οδός δεν επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το ALA μεταβολίζεται μέσω της ω3 οδού σε EPA, DPA-ω-3 και DHA ενώ κατά τη δεύτερη περίπτωση, η θερμοκρασία επηρεάζει τη βιοσύνθεση των ω-3 PUFAs, η οποία πραγματοποιείται μέσω μετατροπής των ω-6 λιπαρών οξέων στα αντίστοιχα ω-3 PUFAs, αντιδράσεις που καταλύονται από τις Δ15 και Δ17 αποκορεσμάσεις (ω-3 αποκορεσμάσεις) (Σχήμα 3).

Τα EFAs, ανάλογα με τη θέση του τελευταίου διπλού δεσμού σε σχέση με την τελική μεθυλική ομάδα διαχωρίζονται σε δυο κύριες κατηγορίες:

- ❖ τα λιπαρά οξέα που ανήκουν στην ω-3 ομάδα (λινολενικός τύπος) και συντίθενται από το α-λινολενικό οξύ (C18:3,ω-3),
- ❖ τα λιπαρά οξέα που ανήκουν στην ω-6 ομάδα (λινελαϊκός τύπος) και συντίθενται από το λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω-6)

Όλα τα απαραίτητα λιπαρά οξέα είναι πολυακόρεστα και συντίθενται στους φυτικούς οργανισμούς από τους οποίους ο άνθρωπος τα παραλαμβάνει μέσω της διατροφικής αλυσίδας διότι όπως ήδη έχει αναφερθεί η *de novo* σύνθεσή τους από τον ανθρώπινο οργανισμό είναι αδύνατη. Το λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω-6) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3, ω-3), μετά την πρόσληψή τους, αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για το σχηματισμό μακρομοριακών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids, LC-PUFAs), που περιέχουν 20 ή και περισσότερα άτομα άνθρακα, καθώς και τρεις ή περισσότερους διπλούς δεσμούς (Ratledge & Wynn, 2002).

Η σύνθεση LC-PUFAs από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, που λειτουργούν ως πρόδρομες ενώσεις, πραγματοποιείται μόνο στα ζωικά κύτταρα, ενώ η σύνθεσή τους στα φυτικά κύτταρα είναι αδύνατη. Επομένως, το ζωικό λίπος αποτελεί κύρια πηγή παραγωγής LC-PUFAs.

Τα EFAs και συγκεκριμένα το λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω-6) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3, ω-3) συντίθενται στους φυτικούς οργανισμούς από τους οποίους ο άνθρωπος τα παραλαμβάνει μέσω της διατροφικής αλυσίδας διότι όπως ήδη έχει αναφερθεί η *de novo* σύνθεσή τους από τον ανθρώπινο οργανισμό είναι αδύνατη. Τα

υπόλοιπα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των ομάδων ω-3 και ω-6 προκύπτουν είτε ως συνέπεια των αντιδράσεων επιμήκυνσης και αφυδρογόνωσης των απαραίτητων λιπαρών οξέων είτε παραλαμβάνονται απευθείας μέσω της διατροφής.

Για παράδειγμα το α-λινολενικό οξύ (C18:3, ω-3) αποτελεί την πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση του εικοσιδυοεξενοϊκού οξέος (DHA, C22:6, ω-3) και του εικοσιπεντενοϊκού οξέος (EPA, C20:5, ω-3). Ο ρόλος του DHA στην ανάπτυξη του εγκεφάλου τονίζεται ιδιαίτερα, καθώς μια διατροφή πλούσια σε DHA συμβάλλει στην αύξηση του μεγέθους του εγκεφάλου και επομένως και στην ανάπτυξη της νοητικής ικανότητας. Επιπλέον το εικοσιπεντενοϊκό οξύ (EPA, C20:5, ω-3) αποτελεί πρόδρομη ένωση της ομάδας ω-3 για τη σύνθεση προσταγλανδινών (Ratledge & Wynn, 2002).

Το λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω-6) αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση του αραχιδονικού οξέος (ARA, C20:4, ω-6) και του γ-λινολενικού οξέος (GLA, C18:3, ω-6). Τα συγκεκριμένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, είναι μεγάλου βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος και η παραγωγή τους πραγματοποιείται σε βιομηχανική κλίμακα. Το αραχιδονικό οξύ (ARA, C20:4, ω-6) και το διομο-γ-λινολενικό οξύ (C20:3, ω-6) είναι πρόδρομες ενώσεις επίσης για τη σύνθεση των προσταγλανδινών (Ratledge & Wynn, 2006).

1.13 Η συμβολή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) στον ανθρώπινο οργανισμό.

Παρά το γεγονός ότι σε γενικές γραμμές τα λιπίδια θεωρούνται επιβλαβή για τη υγεία του ανθρώπου, όταν λαμβάνονται με μέτρο αποτελούν απαραίτητα και ωφέλιμα συστατικά για μια ισορροπημένη διατροφή. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί συμμετέχουν σε σημαντικό βαθμό στη διατροφή και τη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού.

Είναι φανερό ότι η παρουσία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε κάθε οργανισμό είναι απαραίτητη προκειμένου να πραγματοποιηθούν σωστά όλες οι λειτουργίες. Επομένως, η έλλειψη τους σε έναν οργανισμό μπορεί να οδηγήσει σε ανωμαλίες του δέρματος, του νευρικού, του ανοσοποιητικού και του καρδιαγγειακού συστήματος, καθώς και σε νεφρικά, αναπνευστικά και ενδοκρινολογικά προβλήματα (Certik & Shimizu, 1999).

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες που αφορούν στην σπουδαιότητα των ω-3 λιπαρών οξέων και την αναγκαιότητα πρόσληψής τους από τον άνθρωπο

- ✓ Αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση διαφόρων μεταβολιτών-ορμονών (προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες, υδροξυ-λιπαρά οξέα, εικοσανοειδή και θρομβοξάνες) που ρυθμίζουν σημαντικές βιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού (Certik & Shimizu, 1999),
- ✓ συμβάλλουν στη ρύθμιση της δομής, της δυναμικής και της διαπερατότητας των μεμβρανών των ανθρώπινων κυττάρων,

- ✓ ελέγχουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων επηρεάζοντας διάφορες διεργασίες, όπως τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και τη μεταφορά της χοληστερόλης στο ανθρώπινο σώμα,
- ✓ σύμφωνα με επιδημιολογικές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί έδειξαν, μια διατροφή πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της ομάδας ω-3 συμβάλλει στην πρόληψη από σοβαρές ασθένειες, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου και βρογχικό άσθμα,
- ✓ ακόμη αναφέρεται ότι τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μπορεί να έχουν θετικά αποτελέσματα σε ασθένειες όπως η ψωρίαση, οι νοητικές ασθένειες και η ρευματοειδής αρθρίτιδα
- ✓ το λίπος των ψαριών είναι πλούσιο σε λιπαρά οξέα της ομάδας ω-3, όπως το εικοσιπεντενοϊκό οξύ (EPA, C20:5, ω-3) και το εικοσιδυοεξαινοϊκό οξύ (DHA, C22:6, ω-3) απαραίτητα για την λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού,
- ✓ μελέτες υποδεικνύουν ότι λιπαρά οξέα, όπως το γ-λινολενικό οξύ (GLA), μπορεί να αυξήσουν την κυτταροτοξικότητα ενός αντικαρκινικού φαρμάκου σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (Menéndez *et al.*, 2001). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα και τη συμβολή ορισμένων ακόρεστων λιπαρών οξέων στη χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση κακοηθών όγκων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία δεν ανήκουν στην κατηγορία των EFAs, δεδομένου ότι η βιοσύνθεσή τους σε υγιή άτομα είναι εφικτή, θεωρούνται μεγάλης φαρμακευτικής εμπορικής και βιοτεχνολογικής σημασίας επειδή σε καταστάσεις αδυναμίας βιοσύνθεσης τους από τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως λόγω λανθασμένων διατροφικών συνήθειών, άγχους, stress και υπερλιπιδαιμίας, κρίνεται απαραίτητη η πρόσληψή τους μέσω της διατροφής.

1.14 Το γ-Λινολενικό οξύ (GLA, C18:3, ω-6).

Το γ-λινολενικό οξύ είναι πολυακόρεστο λιπαρό οξύ της ομάδας ω-6 με μεγάλη θεραπευτική αξία, αφού είναι πρόδρομη ένωση της προσταγλαδίνης E1 (PGE1) που ο ανθρώπινος οργανισμός χρησιμοποιεί για την αντιμετώπιση των φλεγμονών και για την άμυνα του έναντι παθήσεων, όπως ο καρκίνος, οι καρδιοπάθειες, οι αλλεργίες, το άσθμα, η αρθρίτιδα και οι αυτοάνοσες ασθένειες, καθώς και για την αποφυγή της πρόωρης γήρανσης.

Το γ-λινολενικό οξύ μπορεί να παραχθεί στον ανθρώπινο οργανισμό από το λινολεϊκό οξύ, το οποίο συνήθως είναι άφθονο στη διατροφή του ανθρώπου. Αυτό υποβάλλει την ιδέα ότι και το παραγόμενο από τον ανθρώπινο οργανισμό GLA θα είναι άφθονο και αρκετό για την κάλυψη των αναγκών του ανθρώπινου σώματος. Δυστυχώς, στην πράξη, αυτό δεν συμβαίνει συχνά, επειδή για τη μετατροπή του λινολεϊκού οξέος σε GLA (όπως και για τη μετατροπή του α-λινολενικού οξέος σε EPA και DHA) απαιτείται το ένζυμο D6D (Delta-6-Desaturase), το οποίο συνήθως βρίσκεται σε ανεπαρκείς ποσότητες στο ανθρώπινο σώμα. Μερικοί από τους λόγους αυτούς είναι η ηλικία, το στρες, η άφθονη κατανάλωση ζάχαρης, αλκοόλ, κορεσμένων και υδρογονωμένων λιπών, καθώς και η ανεπάρκεια ενός ή περισσότερων από τα παρακάτω διατροφικά στοιχεία: βιταμίνες C, B-3, B-6,

μαγνήσιο, ψευδάργυρος. Άλλοι λόγοι μπορεί να είναι ορισμένες ασθένειες, όπως υποθυρεοειδισμός, διαβήτης, καρκίνος ή διάφορες ιώσεις.

Με εξαίρεση το μητρικό γάλα η περιεκτικότητα των τροφών σε γ-λινολενικό οξύ (GLA, C18:3, ω-6) είναι περιορισμένη. Επομένως, η πρόσληψη του σε επαρκή ποσότητα για τη λειτουργία και την κάλυψη αναγκών του ανθρώπινου οργανισμού μέσω της διατροφής, έτσι ώστε να επιτυγχάνονται θρεπτικά και θεραπευτικά οφέλη, είναι πρακτικά αδύνατη.

Ωστόσο, αρκετοί μύκητες και ορισμένα μικροφύκη δύνανται να συσσωρεύουν λίπος με ικανοποιητική περιεκτικότητα σε GLA. Οι σημαντικότεροι μικροοργανισμοί που παράγουν GLA είναι οι μύκητες του γένους *Mucor*, *Rhizopus* και *Mortierella*, καθώς και ορισμένα μικροφύκη, όπως *Spirulina platensis* και *Chlorella vulgaris* (Certik & Shimizu, 1999).

Το γ-λινολενικό οξύ (GLA) διαθέτει εκτός από σημαντική διατροφική αξία και θεραπευτικές ιδιότητες. Έρευνες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη GLA έχει θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Ahmed *et al.*, 2009), δερματικών προβλημάτων (έκζεμα), προεμμηνορροϊκής έντασης, φλεγμονών, καρδιοαγγειακών προβλημάτων καθώς και κάποιων μορφών καρκίνου (Hogobin, 1992). Τελευταίες μελέτες έδειξαν ότι τα άλατα λιθίου από μικροβιακά λιπίδια περιέχοντα GLA παρουσίασαν σημαντικό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα έναντι καρκινικής σειράς κυττάρων λευχαιμίας. Ακόμη, μελέτες δεικνύουν ότι λιπαρά οξέα, όπως το γ-λινολενικό οξύ (GLA), μπορεί να αυξήσουν την κυτταροτοξικότητα ενός αντικαρκινικού φαρμάκου σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (Menéndez *et al.*, 2000). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα και τη συμβολή ορισμένων ακόρεστων λιπαρών οξέων στη χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση κακοηθών όγκων.

Η συνεχής μελέτη και η γνώση της αξιοποίησης του γ-λινολενικού οξέος (GLA), τόσο για τις διατροφικές όσο και για τις θεραπευτικές του ιδιότητες, τυγχάνουν συνεχούς εξέλιξης. Είναι ευρέως γνωστό λόγω της ικανότητας του να σκοτώνει τα κύτταρα των όγκων χωρίς ωστόσο να βλάπτει τα φυσιολογικά κύτταρα. Εκτός των αντικαρκινικών ιδιοτήτων του, το GLA φαίνεται να καθυστερεί την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και ρυθμίζει την ταχύτητα της νευρικής αγωγιμότητας και την ισχιακή ροή του αίματος (sciatic endoneurial blood flow).

1.15 Φυσιολογία των ελαιογόνων μικροοργανισμών.

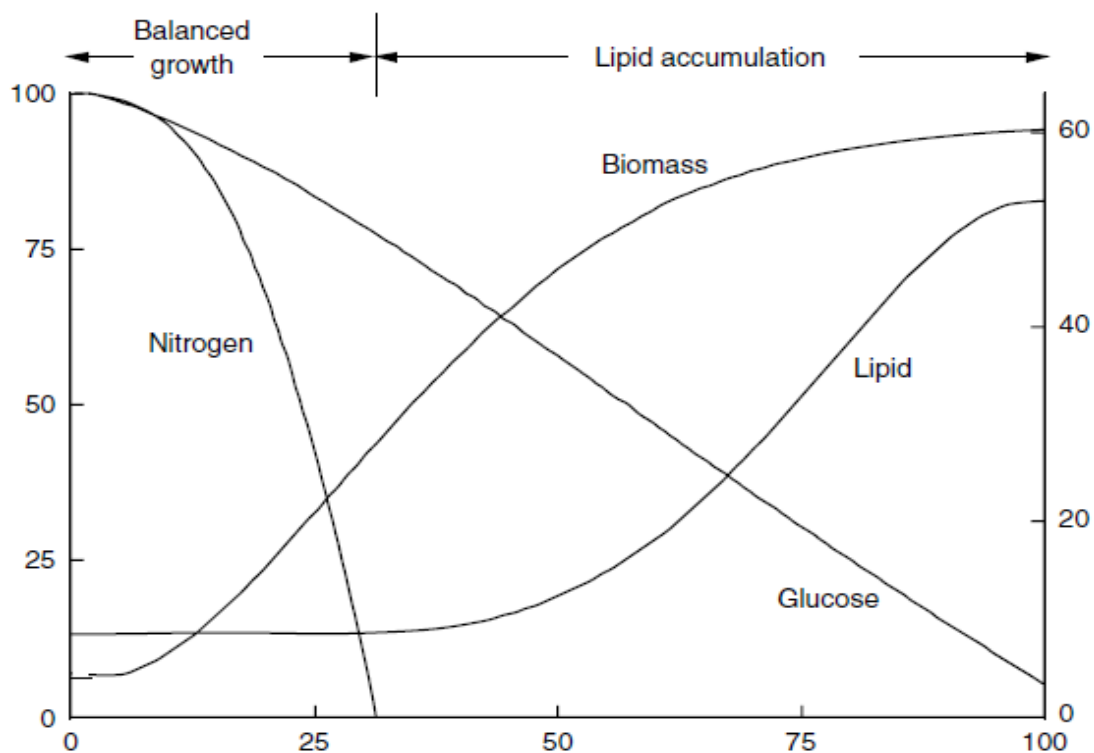
Το έναυσμα για την έναρξη της συσσώρευσης των λιπιδίων δίνεται όταν από το μέσο καλλιέργειας εξαντληθεί κάποιο απαραίτητο συστατικό, συνήθως το άζωτο. Στην περίπτωση αυτή, λόγω του ότι το άζωτο αποτελεί απαραίτητο συστατικό για τη βιοσύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών, σταματά ο πολλαπλασιασμός των μικροβιακών κυττάρων και κατ' επέκταση σταματά η σύνθεση της κυτταρικής βιομάζας. Εκτός από το άζωτο έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλοι περιοριστικοί παράγοντες, με περιορισμένη επιτυχία, όπως είναι το θείο, ο φωσφόρος, το μαγνήσιο και ο σίδηρος.

Ωστόσο, η πηγή άνθρακα συνεχίζει να αφομοιώνεται και με τη δράση των κατάλληλων ενζύμων μετατρέπεται σε αποθεματικά λιπίδια. Οι περιορισμοί αυτοί μπορεί να οφείλονται στην αρνητική επίδραση και σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες

του κυττάρου, εκτός από τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων (Ratledge, 1994).

Η συσσώρευση των λιπιδίων είναι μια διεργασία που επιτελείται κυρίως σε δύο διακριτά στάδια.

- i. Κατά το πρώτο στάδιο, όλα τα θρεπτικά συστατικά βρίσκονται σε ποσότητες ικανές να καλύψουν όλες τις μεταβολικές ανάγκες του μικροοργανισμού με αποτέλεσμα την ισόρροπη αύξησή του (*balanced growth*).
- ii. Στο δεύτερο στάδιο ξεκινά η ελαιογόνος φάση, όταν κάποιο θρεπτικό συστατικό εξαντληθεί από το μέσο καλλιέργειας. Η φάση αυτή διαρκεί μέχρι την εξάντληση από το μέσο καλλιέργειας της πηγής άνθρακα ή κάποιου άλλου συστατικού απαραίτητου για τη διεργασία αυτή ή μέχρις ότου το ποσοστό των συσσωρευμένων λιπιδίων φτάσει μία μέγιστη τιμή η οποία εξαρτάται από τον κάθε μικροοργανισμό.



Εικόνα 5. Κινητική της συσσώρευσης μικροβιακών λιπιδίων από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge and Wynn, 2006)

Η συσσώρευση του μικροβιακού λίπους συνεχίζεται μέχρι ενός ορίου, το οποίο είναι γενετικά καθορισμένο για κάθε μικροοργανισμό και κυμαίνεται από 20%–60% (w/w επί της ξηρής βιομάζας) (Ratledge & Wynn, 2002).

Όταν από το μέσο καλλιέργειας εξαντληθεί η πηγή άνθρακα, τότε ο μικροοργανισμός αποδομεί και καταναλώνει τα συσσωρευμένα λιπίδια και ο ρυθμός της κατανάλωσής του εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Ειδικότερα, αν υπάρχει έλλειψη και σε άλλα θρεπτικά συστατικά εκτός του άνθρακα, τότε ο ρυθμός αποδόμησης των λιπιδίων είναι αργός και εξυπηρετεί κυρίως τις ανάγκες συντήρησης του μικροβιακού κυττάρου. Αντίθετα, αν υπάρχει έλλειψη μόνο της πηγής άνθρακα, η αποδόμηση των λιπιδίων είναι ταχεία, εξαρτώμενη από τον ρυθμό που καταναλώνονται τα προϊόντα της αποδόμησης, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή νέας βιομάζας.

Όλοι οι μικροοργανισμοί είναι απαραίτητο να συνθέσουν μια ελάχιστη ποσότητα λιπιδίων με σκοπό να εφοδιάσουν τις μεμβράνες τους και άλλες δομές, καθώς και για διάφορους λειτουργικούς σκοπούς. Ωστόσο ένας μικρός αριθμός μικροοργανισμών έχει την ικανότητα να συσσωρεύει λιπίδια με τη μορφή τριγλυκεριδίων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% wt/wt επί της ξηρής τους βιομάζας, τα οποία λειτουργούν ως αποθεματικό υλικό (*storage material*). Η ικανότητα αυτή εντοπίζεται κυρίως σε ορισμένα είδη ζυμών και μυκήτων καθώς επίσης και σε ένα μικρό ποσοστό μικροφυκών. Αντίθετα, τα βακτήρια γενικά αντί για τριγλυκερίδια συσσωρεύουν πολυαλκανοϊκά οξέα σαν αποθεματικό υλικό.

1.16 Βιοσύνθεση λιπιδίων από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα για την παραγωγή SCO είναι οι υγροί υδρογονάνθρακες, τα υποστρώματα τύπου σακχάρων (πολυσακχαρίδια και γλυκερόλη), τα υποστρώματα τύπου λιπαρών υλών (λίπη και έλαια χαμηλής προστιθέμενης αξίας) και τα αμυλούχα συστατικά ή απόβλητα. Εξαίρεση αποτελούν τα κυτταρινούχα υλικά και η μεθανόλη που δεν χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για την παραγωγή λιπιδίων.

Υψίστης σημασίας είναι ο τρόπος λιποσυσσώρευσης ανάλογα με το είδος του υποστρώματος

- Στα υποστρώματα τύπου σακχάρων (υδρόφιλα υποστρώματα) η παραγωγή του λίπους ξεκινά έπειτα από την εξάλειψη του περιοριστικού παράγοντα της αύξησης από το μέσο της της καλλιέργειας.
- Στα υποστρώματα τύπου λιπαρών υλών (υδρόφοβα υποστρώματα) η παραγωγή λίπους γίνεται ταυτόχρονα με την παραγωγή της μικροβιακής μάζας.

Για να επιτευχθεί η συσσώρευση των λιπιδίων από έναν ελαιογόνο μικροοργανισμό είναι απαραίτητο ο μικροοργανισμός αυτός να καλλιεργηθεί σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας περιοριστικό ως προς την πηγή αζώτου. Όταν εξαντληθεί το άζωτο από το μέσο καλλιέργειας, ο μικροοργανισμός συνεχίζει να αφομοιώνει την πηγή άνθρακα με αποτέλεσμα τη σύνθεση λιπιδίων υπό μορφή τριγλυκεριδίων (TAG's), τα οποία υπάρχουν σε μορφή λιποσωματίων μέσα στο κύτταρο και παρουσιάζουν μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον. Αντίθετα, όταν ένας μη-ελαιογόνος μικροοργανισμός καλλιεργηθεί σε συνθήκες πενίας αζώτου, ο άνθρακας συνεχίζει να αφομοιώνεται προς το σχηματισμό πολυσακχαριτών (γλυκογόνο, γλυκάνες, μαννάνες κ.ά.).

Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα. Η βιοσύνθεση λιπαρών οξέων από υποστρώματα τύπου σακχάρων (*de novo lipid accumulation*) πραγματοποιείται σε τρία στάδια

1. Δημιουργία του συνενζύμου ακέτυλο-CoA,
2. Αντιδράσεις αντίστροφης β-οξειδωσης,
3. Σύνθεση λιπιδίων υπό μορφή τριγλυκεριδίων (TAG's).

Για να σχηματιστεί το ακέτυλο-CoA είναι απαραίτητο το κιτρικό οξύ να είναι άμεσα διαθέσιμο στο κυτταρόπλασμα διότι εκεί πραγματοποιείται η βιοσύνθεση των λιπιδίων. Το κιτρικό οξύ συντίθεται μέσω του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) στο μιτοχόνδριο του κυττάρου και έπειτα από την εξάντληση της πηγής

αζώτου εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Το κιτρικό οξύ την βιοσυνθετική οδό των λιπαρών οξέων με μόρια ακέτυλο-CoA.

Για να ξεκινήσει η ελαιογένεση πρέπει να ισχύουν δύο απαραίτητες προϋποθέσεις. Αρχικά κρίνεται απαραίτητη η συνεχής παροχή στο κυτταρόπλασμα με το συνένζυμο ακέτυλο-CoA, μόριο που διαδραματίζει κεντρικό ρόλο για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και εν συνεχεία σημαντικός παράγοντας κρίνεται η ικανότητα του κυττάρου να παράγει NADPH σε μεγάλες ποσότητες, το οποίο απαιτείται για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων.

Ο σχηματισμός του ακέτυλο-CoA στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποδίδεται στη διάσπαση του κιτρικού οξέος, μια αντίδραση που καταλύεται από την παρουσία του ενζύμου ATP- κιτρική λυάση (ATP-CL).

Η εξάντληση της πηγής αζώτου στο θρεπτικό μέσο από το μικροοργανισμό οδηγεί σε μια σειρά αντιδράσεων με αποτέλεσμα το σχηματισμό του ακέτυλο-CoA. Επομένως λόγω της έλλειψης του αζώτου ενεργοποιείται το ένζυμο AMP-απαμινάση προκαλώντας απαμίνωση του AMP με αποτέλεσμα την ταχύτατη πτώση της περιεκτικότητας του κυττάρου σε AMP και την παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH) λόγω της αύξησης του λόγου ATP/AMP εντός του μικροβιακού κυττάρου. Με αυτό τον τρόπο το κιτρικό οξύ δε μπορεί να μεταβολιστεί και συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο. Επομένως οι μικροοργανισμοί αποδομούν τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (monophosphate- AMP), αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο απαμινάση της AMP με σκοπό να εξοικονομήσουν άζωτο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (αντίδραση I).

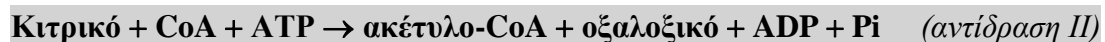


(αντίδραση I)

Έχει βρεθεί ότι η ενεργότητα της απαμινάσης του AMP σε συνθήκες πενίας αζώτου είναι πέντε φορές υψηλότερη συγκρινόμενη με την ενεργότητα εκείνη όταν υπάρχει άζωτο στο μέσο καλλιέργειας.

Ύστερα από την κρίσιμη συγκέντρωση ανοχής των μιτοχονδρίων, το κιτρικό οξύ εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα και διασπάται από την ATP-κιτρική λυάση σε ακέτυλο-CoA και σε οξαλοξικό οξύ.

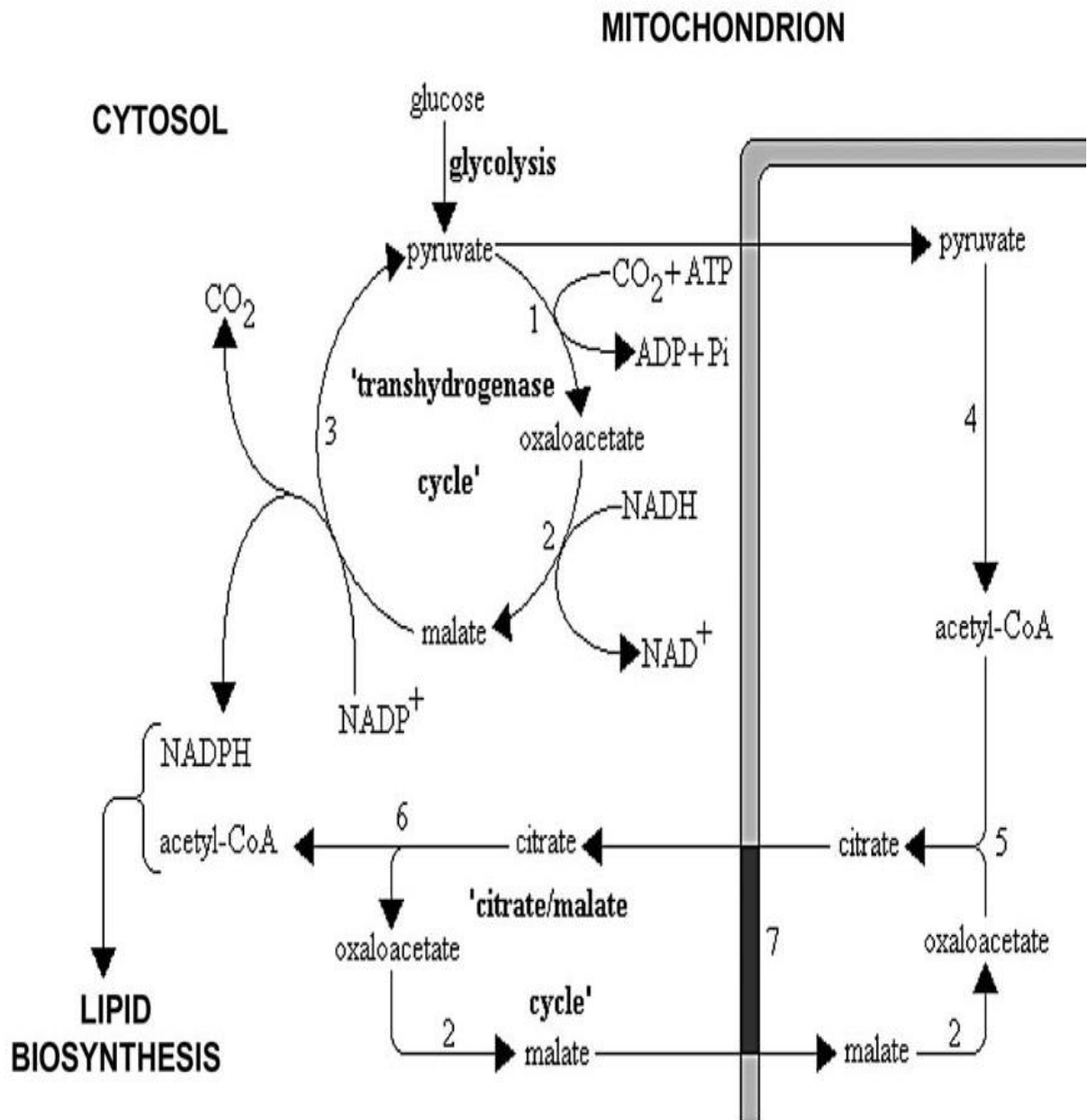
Έπειτα, το ακέτυλο-CoA χρησιμοποιείται ως προάγγελος για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος σε μηλικό, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται στον κύκλο κιτρικού/μηλικού οξέος (Ratledge, 2002) (Σχήμα 4). Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



Για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, εκτός από την παραγωγή του ακέτυλο-CoA, είναι απαραίτητη η παροχή επαρκούς ποσότητας NADPH. Γεννήτρια NADPH στα κύτταρα των ελαιογόνων μικροοργανισμών αποτελεί ο κύκλος του μηλικού οξέος. Το μηλικό ένζυμο λειτουργεί ως προμηθευτής NADPH κατά την ακόλουθη εξίσωση:

Μηλικό οξύ + NADP → πυροσταφυλικό + CO₂ + NADPH (αντίδραση III)

Η συσσώρευση λιπιδιακών αποθεμάτων ελέγχεται από την παρεμπόδιση που ασκούν οι μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας λιπαροί εστέρες του CoA (FACES) επί του ενζύμου ATP-CL και επί της εξόδου του κιτρικού οξέος στο κυτταρόπλασμα (Αγγελής, 2007)

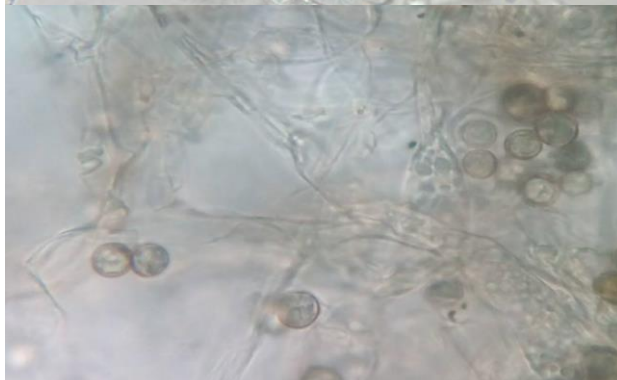
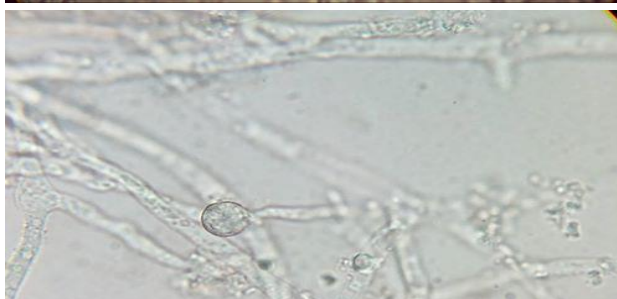
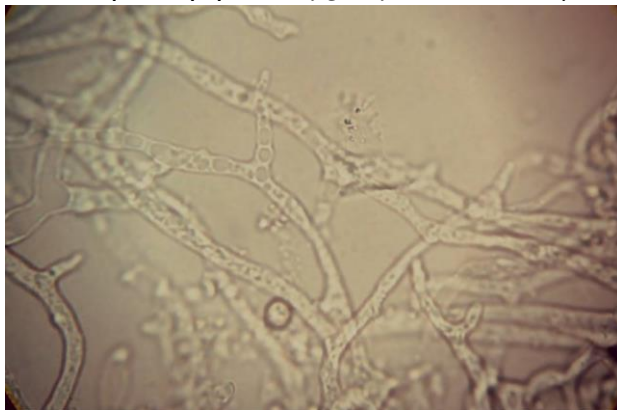


Σχήμα 4. Απεικόνιση του κύκλου του Krebs (transhydrogenase cycle) και του κύκλου του κιτρικού/μηλικού οξέος (citrate/malate cycle) ως προάγγελοι στην παραγωγή του ακετύλο-CoA και NADPH, για τη λιπογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP:κιτρική λύση, 7. ένζυμο υπεύθυνο για τη λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχόνδριου και κυτταροπλάσματος (Ratledge, 2002).

1.17 Η κλάση των Ζυγομυκήτων –Το στέλεχος *Thamnidium elegans*.

Η συνεχής απαίτηση για την παραγωγή λιπιδίων υψηλής διατροφικής και θεραπευτικής αξίας έστρεψε το ενδιαφέρον σε ελαιογόνους μύκητες, όπως εκείνους της κλάσης των Ζυγομυκήτων, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να παράγουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Οι ζυγομύκητες ανήκουν στο φύλο *Zygomycota* το οποίο αποτελείται από δυο κλάσεις, τη μεγάλη σε έκταση και σπουδαιότητα κλάση *Zygomycetes* και την κλάση *Trichomycetes*. Η κλάση των *Zygomycetes* αποτελείται από 900 περίπου είδη, πολλά εκ των οποίων παρουσιάζουν μεγάλο βιομηχανικό και ερευνητικό ενδιαφέρον. Το διακριτικό τους γνώρισμα είναι ο σχηματισμός των ζυγοσπορίων, δηλαδή σπορίων εγγενούς αναπαραγωγής που σχηματίζονται εντός των ζυγοσποριαγγείων. Η κλάση αυτή διαιρείται σε επτά τάξεις, τις *Mucorales*, *Dimargaritales*, *Kickxellales*, *Endogonales* (*Gomales*), *Entomophthorales*, *Zoopagales* και *Harpellales* (Αγγελής, 2007).

Ο μύκητας *Thamnidium elegans* ανήκει στην τάξη των *Mucorales* που είναι η πολυπληθέστερη των *Zygomycetes*. Οι σωματικές υφές των μυκήτων της τάξης των



Εικόνα 6. Το στέλεχος *Thamnidium elegans* CCF-1465 Πηγή-παρούσα μελέτη.

Mucorales είναι κοινοκυτταρικές, ενώ η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται με το σχηματισμό μεγάλων σποριάγγειων ή μικροτέρων σποριαγγείων που καλούνται σποριαγγείδια. Χαρακτηριστικό είναι ότι ο *Thamnidium elegans* σχηματίζει κανονικά σποριάγγεια στο άκρο των σποριαγγειοφόρων και μικροσποριάγγεια, sporiangioles με δώδεκα ή περισσότερα σπόρια στη βάση του υπό μορφή θυσάνου. (Μπαλατσούρας, 2006)

Οι μύκητες της τάξης των *Mucorales* παρουσιάζουν μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον, δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ποικίλων ενζύμων και μεταβολιτών όπως οργανικά οξέα (φουμαρικό, γαλακτικό, κιτρικό κ.ά.), ενώ συμμετέχουν και σε κάποια στάδια παραγωγής αντιβιοτικών σε βιομηχανική κλίμακα όπως κορτιζόνη καθώς αποτελούν και βιοτεχνολογικό εργαλείο για την παραγωγή λιπιδίων τα οποία είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και κυρίως γ-λινολενικό οξύ.

2. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ικανότητας του μύκητα *Thamnidium elegans* CCF-1465, να αναπτύσσεται σε θρεπτικά υποστρώματα με βάση τη σακχαρόζη, τη μελάσα, που αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής ζάχαρης και τη γλυκερόλη που παράγεται ως υποπροϊόν της βιομηχανίας βιοντίζελ με σκοπό τη παραγωγή βιομάζας, λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών.

Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκε η σύσταση των λιπαρών οξέων ώστε να διαπιστωθεί η καταλληλότητα τους για χρήση στη παραγωγή 2^{ης} γενιάς βιοντίζελ ή και σε άλλους τομείς όπως της διαιτολογίας και της φαρμακευτικής, αν η σύσταση τους μοιάζει με αυτή διαφόρων φυτών που περιέχουν το γ-λινολενικό οξύ (GLA) το οποίο παρουσιάζει σημαντικό φαρμακευτικό και διατροφικό ενδιαφέρον. Ακόμη πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμπερτάσης του εν λόγω στελέχους καθώς μελετήθηκε και η ικανότητα του να αποχρωματίζει τη μελάσα συμβάλλοντας στα πλαίσια της Πράσινης Ανάπτυξης μέσω της αξιοποίησης ενός αποβλήτου που προέρχεται από τη Βιομηχανία Τροφίμων.

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε είναι το *Thamnidium elegans* CCF-1465 που ανήκει στη κατηγορία των ζυγομηκύτων. Πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες, ασυνεχούς τύπου, σε αναδευόμενες φιάλες, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις μελάσας, συνδυασμού μελάσας και γλυκερόλης και καθαρής σουκρόζης. Επιθυμώντας να κατευθυνθεί μεταβολισμός του εν λόγω μικροοργανισμού προς τη παραγωγή λιπιδίων, έπρεπε ο λόγος άνθρακα προς άζωτο να είναι ο μεγαλύτερος δυνατός.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν μέτρηση της ξηρής βιομάζας, εκχύλιση των λιπιδίων για το προσδιορισμό της ποσότητας τους, κλασμάτωση, προσδιορισμός της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα καθώς και προσδιορισμός της συγκέντρωσης και του είδους των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών, μέτρηση της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμπερτάσης και προσδιορισμός του βαθμού αποχρωματισμού του αποβλήτου. Ο μύκητας *Thamnidium elegans* αποτελεί έναν από τους λιγότερο μελετημένους μικροοργανισμούς στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά στις ζυμώσεις για τη παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, παρόλο που υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικά με τη φυσιολογία και τις συνθήκες που επηρεάζουν την ανάπτυξή του. Πιο συγκεκριμένα υπάρχει αναφορά για την ανάπτυξή του σε καλλιέργειες στερεής φάσης σε απόβλητα από καρπό μήλου (*Stredansky et al.*, 2000) προς παραγωγή GLA και πιο πρόσφατα πραγματοποιήθηκε μελέτη της ανάπτυξης και παραγωγής λίπους σε υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιώντας σαν πηγή άνθρακα μεμονωμένα σάκχαρα όπως γλυκόζη, φρουκτόζη και σουκρόζη καθώς και σε υποστρώματα με βάση λιγνοκυτταρινούχες ύλες (*Papanikolaou et al.*, 2010; *Zikou et al.*, 2013).

Είναι σαφές ότι παραγωγή του μικροβιακού λίπους είναι εξαιρετικά δαπανηρή και γίνονται σημαντικές προσπάθειες ώστε να μειωθεί το κόστος της. Η αξιοποίηση της μελάσας που περιέχει σουκρόζη στο μεγαλύτερο ποσοστό της, αλλά και γλυκόζη και φρουκτόζη σε σημαντικές ποσότητες σε συνδυασμό με την γλυκερόλη με σκοπό τη παραγωγή λιπιδίων και πιθανώς άλλων δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί μια εναλλακτική λύση δεδομένου ότι πρόκειται για δύο απόβλητα τα οποία αποτελούν εξαιρετικές πηγές άνθρακα για την καλλιέργεια και ανάπτυξη των ελαιογόνων μικροοργανισμών.

3. Υλικά και μέθοδοι.

3.1. Το βιολογικό υλικό.

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Thamnidium elegans* CCF-1465 (Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και Μικροβιολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών) που ανήκει στην κλάση των Ζυγομυκήτων.

Η διατήρηση του στελέχους γινόταν σε κεκλιμένους σωλήνες πεπληρωμένους με θρεπτικό μέσο PDA (Potato Dextrose Agar) στους 4 °C. Προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα του πραγματοποιούνταν ανανεώσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα, ενώ πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου το στέλεχος ανανεωνόταν προκειμένου να είναι ηλικίας περίπου 5 ημερών.

3.2. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων.

Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες όγκου 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 τους (50±1 mL) με το αντίστοιχο θρεπτικό μέσο κάθε φορά. Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν η μελάσα (άγνωστης προέλευσης), η γλυκερόλη (Πέττας, 95%), και η καθαρή σουκρόζη (προερχόμενη από την Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης) είτε μόνες τους σε διάφορες συγκεντρώσεις είτε σε συνδυασμό με τη μορφή μίγματος (μελάσα-γλυκερόλη).

Μαζί με την εκάστοτε πηγή άνθρακα (μόνη ή σε συνδυασμό) προθέτονταν και ένα μίγμα αλάτων, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις αλάτων στο θρεπτικό μέσο (Papanikolaou et al., 2001)

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
KH₂PO₄	7
Na₂HPO₄	2.5
MgSO₄*7H₂O	1.5
FeCl₃*6H₂O	0.15
ZnSO₄*7H₂O	0.02
MnSO₄*H₂O	0.06
CaCl₂*2H₂O	0.15

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με υπόστρωμα μελάσας (50 g/L) σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Οι πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τοθειϊκό αμμώνιο [(NH₄)₂SO₄] ως ανόργανη πηγή αζώτου, το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) και η πεπτόνη ως οργανική πηγή αζώτου με τις παρακάτω συγκεντρώσεις και συνδυασμούς.

- Peptone 2 g/L & yeast extract 1 g/L,
- Yeast extract 1 g/L και προσθήκη [(NH₄)₂SO₄] σε συγκέντρωση η οποία προσέφερε το αντίστοιχο ποσοστό αζώτου με την προθήκη Peptone 2 g/L,
- Χωρίς προσθήκη Peptone ή yeast extract ή [(NH₄)₂SO₄].

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να στραφεί ο μεταβολισμός προς παραγωγή μικροβιακού λίπους επομένως ο λόγος C/N έπρεπε να είναι όσος το δυνατό υψηλότερος προκειμένου να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Η

συγκεκριμένη μελάσα προερχόμενη από την Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης (EBZ-Σίνδος Θεσσαλονίκης), όπως ήδη αναφέρθηκε, ήταν πλούσια σε άζωτο. Η επιπλέον προσθήκη αζώτου στο συγκεκριμένο υπόστρωμα οδήγησε στην αυξημένη παραγωγή βιομάζας λειτουργώντας ως τροχοπέδη στην λιποσυσσώρευση και διατηρώντας τον λόγο C/N σε χαμηλά επίπεδα.

Για τον άνω λόγο στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με υπόστρωμα τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα δεν έγινε καμία προσθήκη πηγής αζώτου επειδή το συγκεκριμένο απόβλητο παρουσίαζε υψηλή συγκέντρωση σε ελεύθερο άζωτο και πρωτεΐνη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με υπόστρωμα τη καθαρή σουκρόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, έγινε προσθήκη πηγής αζώτου και συγκεκριμένα [(NH₄)₂SO₄] αντίστοιχης ποσότητας με αυτής της μελάσας.

Ακόμη σε προσπάθεια να αυξηθεί ο λόγος C/N με στόχο να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους πραγματοποιήθηκε ζύμωση με συνδυασμό των αποβλήτων μελάσα και γλυκερόλη στην οποία δεν υπήρξε επίσης καμία προσθήκη πηγής αζώτου.

Το pH του μέσου καλλιέργειας ρυθμιζόταν στο 6,0±0,1 με προσθήκη διαλύματος KOH 5M ή HCl 5M. Μετά την παρασκευή του εκάστοτε υποστρώματος ακολουθούσε η μεταφορά του σε κωνικές φιάλες των 250 mL, κάθε μια εκ των οποίων περιείχε 50±1 mL θρεπτικού μέσου και στη συνέχεια τοποθετούνταν στο αυτόκλειστο για αποστείρωση (115 °C, 20 min).

Μαζί με τις φιάλες προς αποστείρωση, προστίθετο και δυο μικρότερες φιάλες Duran των 100 mL, η μια πεπληρωμένη με ποσότητα απιονισμένου νερού που περιείχε 2-3 σταγόνες διαλύματος tween ώστε να επιτευχθεί καλύτερη διασπορά των σπορίων του μύκητα και η άλλη κενή. Μετά την αποστείρωση των φιαλών, πραγματοποιούνταν ο εμβολιασμός του θρεπτικού μέσου στις φιάλες. Αρχικά προστίθετο το διάλυμα απιονισμένου νερού- tween υπό ασηπτικές συνθήκες στον κεκλιμένο σωλήνα που περιείχε το μύκητα, και μετά από έντονη ανάδευση του σωλήνα παραλαμβάνονταν τα σπόρια του μύκητα στο εναιώρημα, το οποίο συλλεγόταν στην κενή αποστειρωμένη κωνική φιάλη υπό ασηπτικές συνθήκες.

Για την παραγωγή σπορίων οι μύκητες καλλιεργήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar (PDA) 39 g/l με κεκλιμένη επιφάνεια, οι οποίοι επώαστηκαν στους 28 ± 1 °C. Μετά από ικανοποιητική σποριογονία των μυκήτων (περίπου μετά από 5-6 ημέρες επώαση) προστέθηκαν στο σωλήνα της καλλιέργειας 10 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού και ο σωλήνας ανακινήθηκε για 1 min περίπου σε αναδευτήρα vortex, ώστε να ελευθερωθούν τα σπόρια. Η μέτρηση της περιεκτικότητας του εναιωρήματος σε σπόρια έγινε με αιματοκυττόμετρο τύπου Blutzalkammer.

Στη συνέχεια οι κωνικές φιάλες εμβολιάστηκαν με 1 ml εναιωρήματος σπορίων του μύκητα, που περιείχε περίπου 1,26*10⁶ σπόρια. Μετά τον εμβολιασμό οι φιάλες τοποθετούνταν σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο στις 150 rpm και σε θερμοκρασία T=27 °C.

3.3. Μέθοδοι Ανάλυσης.

3.3.1. Προσδιορισμός pH.

Το pH της εκάστοτε καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου HI 2211 pH meter. Μετά την μέτρηση του εκάστοτε σημείου της κινητικής, πραγματοποιείτο διόρθωση του pH στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, όπου ήταν αναγκαίο, έτσι ώστε η τιμή του pH να επιστρέψει στην επιθυμητή τιμή του ($6,0 \pm 0,1$). Η διόρθωση του pH γινόταν με προσθήκη διαλύματος καυστικού καλίου (KOH 5M) ή διαλύματος υδροχλωρίου (HCl 5M) υπό ασηπτικές συνθήκες.

3.3.2 Προσδιορισμός παραγόμενης βιομάζας.



Αρχικά η συλλογή του μυκηλίου πραγματοποιήθηκε ύστερα από φυγοκέντρηση ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 9000 rpm, 10 min) ακολουθούμενη από διήθηση μέσω ηθμού Whatman No. 1. Το διήθημα (μέσο καλλιέργειας) συλλέχτηκε σε φιαλίδια Falcon (15 mL) και αποθηκεύθηκε σε θερμοκρασία $-20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, μέχρι τη διεξαγωγή των αναλύσεων.

Ακολούθησε δεύτερη από φυγοκέντρηση ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 9000 rpm, 10 min) και διήθηση μέσω ηθμού Whatman No. 1. Μετά το πέρας της δεύτερης φυγοκέντρησης η βιομάζα πλύθηκε διαδοχικά με απιονισμένο νερό (αρκετές φορές). Μετά από επαρκή πλύση η βιομάζα τοποθετούνταν σε προζυγισμένο φιαλίδιο τύπου McCartney και οδηγείτο στο φούρνο προς ξήρανση ($90 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) μέχρι σταθερού βάρους.



Ο προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας στις κωνικές φιάλες καλλιέργειας πραγματοποιούνταν με μέτρηση του ξηρού βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγιζόταν σε ζυγό ακριβείας (τύπου Sartorius basic), εκφρασμένο σε g/L και η βιομάζα που προσδιορίστηκε ορίστηκε ως ολική βιομάζα (X).

Εικόνα 7. Μυκήλιο του *T. elegans* και συλλογή της παραχθείσας βιομάζας, Πηγή- παρούσα μελέτη.

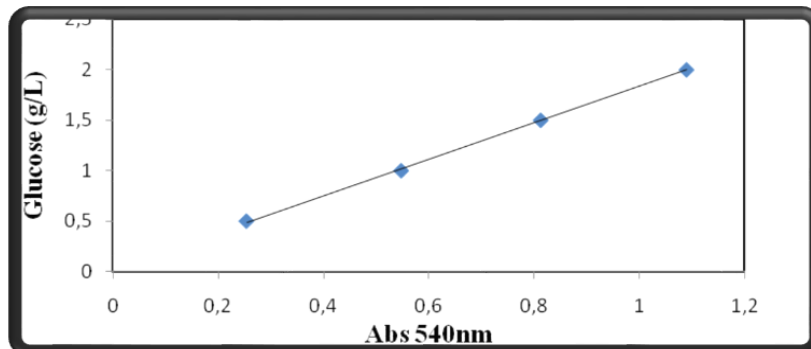
3.3.3. Προσδιορισμός συνολικών σακχάρων με όξινη υδρόλυση και τη μέθοδο DNS.

Το κύριο σάκχαρο που απαντάται στη μελάσα είναι η σουκρόζη και σε μικρότερες ποσότητες η ελεύθερη γλυκόζη και φρουκτόζη. Η σουκρόζη δεν είναι άναγον σάκχαρο και για να είναι εφικτός ο προσδιορισμός της με τη μέθοδο DNS πραγματοποιήθηκε σε πρώτο στάδιο όξινη υδρόλυση με στόχο τη διάσπαση του εν λόγω δισακχαρίτη στα μονομερή συστατικά του δηλαδή την γλυκόζη και τη φρουκτόζη και έπειτα ο προσδιορισμός της γλυκόζης και της φρουκτόζης στα θρεπτικά υποστρώματα με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα και τη σουκρόζη πραγματοποιήθηκε με τη φωτομετρική μέθοδο του δι-νιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

Κατά τη χημική υδρόλυση σε 1 mL δείγματος (κατάλληλα αραιωμένο με απιονισμένο νερό) προστίθεντο 4,5 mL διαλύματος υδροχλωρίου HCl 1M και εν συνεχεία ακολουθούσε βρασμός για 30 min στους 100 °C. Έπειτα τα δείγματα ψύχονται αμέσως σε H₂O θερμοκρασίας δωματίου για 5 min και ακολουθεί προσθήκη 4,5 mL διαλύματος καυστικού καλίου KOH 1M ώστε να επέλθει η εξουδετέρωση (pH=7).

Για τον προσδιορισμό της γλυκόζης και της φρουκτόζης ακολούθησε η φωτομετρική μέθοδος του δι-νιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5 δι-νιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ, παρουσία NaOH και την ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ (Miller, 1959).

Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0.5 mL δείγματος και 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και αναδεύονται. Ακολουθεί ο βρασμός των δειγμάτων (100 °C) για 5 min ακριβώς και έπειτα ψύχονται αμέσως σε H₂O (25 °C). Έπειτα, προστίθενται 5 mL απιονισμένο νερό στα δείγματα, αναδεύονται και ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm.



Σχήμα 5. Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης με τη μέθοδο DNS-Πηγή παρούσα μελέτη.

$$y = 1,7334x - 0,0398$$

$$R^2 = 0,9993$$

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων (γλυκόζη και φρουκτόζη) στα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε οι παραπάνω

καμπύλη αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γλυκόζης (g/L). Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

3.3.4 Προσδιορισμός σακχάρων και γλυκερόλης με HPLC .

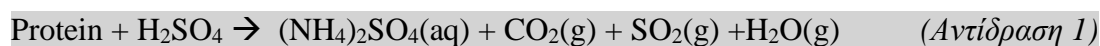
Ο προσδιορισμός της σακχαρόζης, της γλυκόζης, της φρουκτόζης και της γλυκερόλης στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με υπόστρωμα τον συνδυασμό μελάσας-γλυκερόλης έγινε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) σε σύστημα Waters 600E. Η ανίχνευση των σακχάρων αυτών έγινε σε σύστημα RI εφοδιασμένο με διαφορικό διαθλασίμετρο. Η ταυτοποίηση των σακχάρων βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης, ο οποίος ταυτοποιήθηκε με γνωστά δείγματα των αντίστοιχων σακχάρων.. Όλα τα δείγματα αρχικά αραιώνονταν 1/10 και στην συνέχεια φιλτράρονταν με την χρήση φίλτρων whatman που διέθεταν μεμβράνη διαμέτρου οπών 0.2 μm.

Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αραιό διάλυμα H₂SO₄ (5 mM) σε απιονισμένο, απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό με ροή 0.6 mL/min. Η στήλη (στατική φάση) με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου Aminex HPX-87H (Bio-rad, Richmond, USA) (30cmx7,8 mL) και θερμοκρασίας T=57 °C. Από τη στήλη

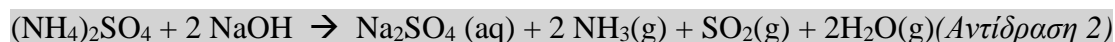
περνούσαν 50 μl δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 20 min. Τέλος στο αποτέλεσμα περιλαμβάνονταν και η αραιώση των δειγμάτων.

3.3.5 Προσδιορισμός ολικού αζώτου και πρωτεΐνης με τη μέθοδο Kjeldhal.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του υποστρώματος στις ζυμώσεις της μελάσας ως μοναδικής πηγής άνθρακα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kjeldhal. Η εν λόγω μέθοδος αποτελεί τη συνηθέστερη μέθοδο προσδιορισμού της συνολικής πρωτεΐνης και στηρίζεται στην μετατροπή των αζωτούχων συστατικών τους σε αμμωνιακά άλατα. Κατά την ανάλυση των δειγμάτων αρχικά πραγματοποιήθηκε καύση (Αντίδραση 1) όπου το οργανικό άζωτο αντιδρά με θειικό οξύ, παρουσία καταλύτη και μετατρέπεται σε θειικό αμμώνιο. Η πραγματική ποσότητα του οξέος που απαιτείται εξαρτάται από παράγοντες όπως η αποδοτικότητα του συστήματος εξάτμισης και το ποσοστό του μη πρωτεϊνικού περιεχομένου στο δείγμα.



Η καύση ολοκληρώνεται όταν το χρώμα του δείγματος καταστεί διαυγές πρασινογάλαζο. Ακολούθησε απόσταξη η οποία πραγματοποιείται σε αλκαλικό περιβάλλον (Αντίδραση 2) και το θειικό αμμώνιο μετατρέπεται σε αμμωνία και λαμβάνεται με τη μορφή βορικού αμμωνίου (Αντίδραση 3).



Στο τέλος τα δείγματα τιτλοδοτήθηκαν παρουσία υδροχλωρίου HCl (0,1N) και η ποσότητα HCl που καταναλώθηκε μετατράπηκε σε ποσότητα αζώτου και έπειτα εκφράστηκε σε ποσότητα πρωτεΐνης. Κατά την διάρκεια της πειραματικής πορείας απαιτείται λευκός προσδιορισμός έτσι ώστε το άζωτο που τυχόν υπάρχει στα αντιδραστήρια να μην συνυπολογιστεί στο άζωτο των αγνώστων δειγμάτων.

Η ποσότητα ολικού αζώτου του εκάστοτε δείγματος υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(\text{mlsample} - \text{mlblank}) * N * 14,007 * 100}{\text{mg sample}}$$

Στη συνέχεια η ποσότητα αζώτου που προκύπτει πολλαπλασιάστηκε με ένα εμπειρικό συντελεστή (6,25) και εκφράστηκε σε ποσότητα πρωτεΐνης % του δείγματος.

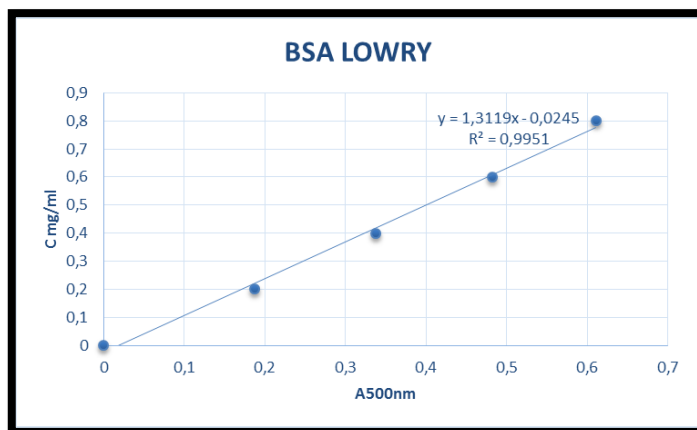
3.3.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών υποστρώματος με τη μέθοδο Lowry.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών του υποστρώματος στις ζυμώσεις της μελάσας ως μοναδικής πηγής άνθρακα αλλά και στη ζύμωση που έλαβε χώρα με

υπόστρωμα τον συνδυασμό μελάσας-γλυκερόλης πραγματοποιήθηκε επίσης και με τη μέθοδο Lowry. Τα αντιδραστήρια που παρασκευάστηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων ήταν:

- ✓ Διάλυμα Α. 2% Na_2CO_3 σε 0,1N NaOH ,
- ✓ Διάλυμα Β. 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε 1% διάλυμα τρυγικού νατρίου.
- ✓ Διάλυμα Γ. 50 mL διαλύματος Α αναμιγνύονται με 1 mL διαλύματος Β λίγο πριν χρησιμοποιηθούν.
- ✓ Διάλυμα Δ. Αντιδραστήριο Follin αραιωμένο με απιονισμένο νερό (1:1, vol:vol)

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεντο 1 mL του εκάστοτε δείγματος και 5 mL διαλύματος Γ. Ακολουθούσε ανάδευση με τη χρήση αναδευτήρα και το μίγμα αντιδραστηρίου-δείγματος παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 10 min. Στη συνέχεια προστίθεντο 0,5 mL αντιδραστηρίου Δ υπό έντονη και γρήγορη ανάδευση του μίγματος. Το μίγμα αντιδραστηρίου-δείγματος παρέμενε σε ηρεμία για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 500 nm. Ο



Σχήμα 6. Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης με την μέθοδο Lowry- Πηγή παρούσα μελέτη.

προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρήση της παρακάτω πρότυπης καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε σύμφωνα με γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης (BSA-Bovine Serum Albumin) μεγαλύτερες από 0,1 mg/mL διότι η καμπύλη αναφοράς παρουσιάζει δύο ευθύγραμμα τμήματα με

διαφορετική κλίση το καθένα επειδή το χρώμα της αντίδρασης δεν είναι ανάλογο με το ποσό της πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα δείγματα εκφράστηκε σε (g/L) και όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

3.3.7 Προσδιορισμός αποχρωματισμού μελάσας.

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού αποχρωματισμού της μελάσας ορίστηκε ως σημείο αναφοράς η απορρόφηση του δείγματος μελάσας πριν τον εμβολιασμό στα 475 nm, με αραιώση 1/10 (Dahiya *et al.*, 2001; Thakkar *et al.*, 2006). Στην συνέχεια λαμβάνονταν μέτρηση της απορρόφησης του υπερκείμενου της καλλιέργειας από κάθε σημείο της κινητικής στο ίδιο μήκος κύματος και στην ίδια αραιώση. Η διαφορά απορρόφησης μεταξύ του αρχικού σημείου και του εκάστοτε σημείου κινητικής εκφράστηκε σε ποσοστό επί τοις %, δηλαδή:

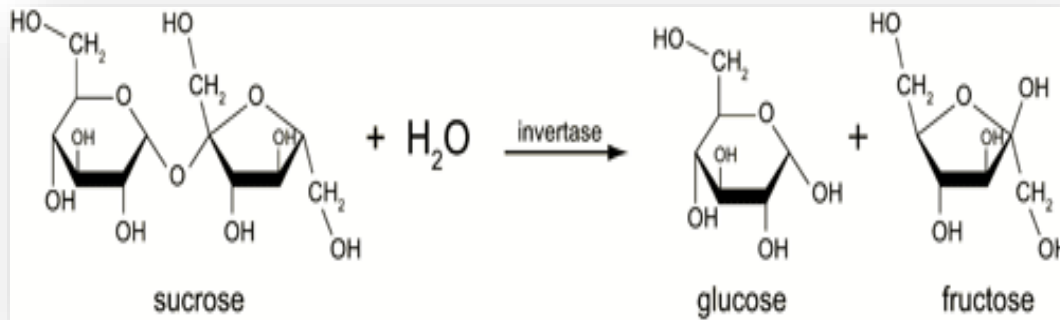
$$A = (A_0 - A_i) / A_0 * 100$$

όπου: A_0 η απορρόφηση στις 0 ώρες

A_i η απορρόφηση στο κάθε σημείο της κινητικής.

3.3.8 Προσδιορισμός ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης.

Για τη μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου εξωκυτταρικής ιμβερτάσης κατά την καλλιέργεια του *Thamnidium elegans* σε υποστρώματα μελάσας, γλυκερόλης και του συνδυασμού μελάσας-γλυκερόλης ακολουθήθηκε η μέθοδος των Oliveira *et al.* (2006), με πιο απλοποιημένη πειραματική διαδικασία. Ο μύκητας δύναται να παράξει ενδοκυτταρική ιμβερτάση ένζυμο που καταλύει την παρακάτω αντίδραση (Εικόνα 8) με στόχο την διάσπαση της σούκρως στα μονομερή της και μετέπειτα κατανάλωση αυτών εκ του υποστρώματος.



Εικόνα 8. Δράση ιμβερτάσης σε σακχαρόζη

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεντο 0,1 mL δείγματος και 0,9 mL διαλύματος σακχαρόζης (1% w/v, σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7). Στη συνέχεια ακολουθούσε θέρμανση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50 °C για την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης. Ο χρόνος παραμονής των δειγμάτων στο υδατόλουτρο ήταν 30 min και έπειτα ακολουθούσε βρασμός στους 100 °C για 5 min για τον τερματισμό της αντίδρασης. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα πλην του σταδίου της ενζυμικής αντίδρασης. Στο τέλος η ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος DNS όπως περιγράφεται σε προηγούμενο εδάφιο (παράγραφος 3.3.3) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μονάδες ενζυμικής ενεργότητας.

Για την ιμβερτάση ως 1 Unit ορίζεται ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου η οποία υδρολύει 1 μmol υποστρώματος (σακχαρόζη) ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος και θερμοκρασία 50 °C. Ο χρόνος παραμονής των δειγμάτων στο υδατόλουτρο ορίστηκε 30 min ως ο βέλτιστος προτεινόμενος χρόνος παραμονής σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέτρηση της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης πραγματοποιούνταν άμεσα έπειτα από την παραλαβή του κάθε σημείου των ζυμώσεων που έλαβαν χώρα.

3.3.9 Μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους.

Έπειτα από κάθε ζύμωση που έλαβε χώρα πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού για κάθε σημείο της ζύμωσης και ποιοτική ανάλυση στην πλειοψηφία των δειγμάτων που προέκυψαν από κάθε καλλιέργεια.

3.3.9.1 Εκχύλιση λίπους.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ενδοκυτταρικού λίπους που παρήχθη από το μύκητα *T. elegans* σε κάθε μια από τις ζυμώσεις ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Μετά την παραλαβή και την ξήρανση της βιομάζας του εκάστοτε δείγματος, προστίθετο ποσότητα μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl₃)-μεθανόλης σε αναλογία 2:1 (Folch *et al.*, 1957). Το χρησιμοποιούμενο διάλυμα έχει την δυνατότητα να εκχυλίζει το συνολικό μικροβιακό λίπος.

Στη συνέχεια, η βιομάζα με το μίγμα των διαλυτών υφίστατο διήθηση και το διήθημα αυτό προστίθετο σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης. Έπειτα, ακολουθούσε εξάτμιση του διηθήματος από την φιάλη εξάτμισης με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα (flash evaporator) έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και να παραμείνει μόνο το μικροβιακό λίπος. Μετά την πλήρη απομάκρυνση των διαλυτών τα ενδοκυτταρικά λιπίδια (L) ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας και εκφράστηκαν σε g μικροβιακών λιπιδίων ανά 100 g ξηρής βιομάζας (L/X, %) ή ανά λίτρο (l) καλλιέργειας (L, g/L).

Η ποσότητα της ελεύθερης λιπιδίων βιομάζας (X_f) υπολογίστηκε με αφαίρεση των ολικών μικροβιακών λιπιδίων (L) από την ολική βιομάζα (X).

3.3.9.2 Κλασμάτωση λιπιδίων (fractionation).

Μετά την εκχύλιση του ενδοκυτταρικού λίπους και τον ποσοτικό προσδιορισμό του, ακολουθεί η κλασμάτωση η οποία γίνεται σε επιλεγμένο αριθμό δειγμάτων από κάθε ζύμωση.

Για την προετοιμασία των λιπιδίων προς κλασμάτωση, πραγματοποιήθηκε έκπλυση των λιπιδίων με 0.88% KCl και παραλαμβάνονταν η κάτω φάση. Στη συνέχεια, προστίθετο Na₂SO₄ (άνυδρο θειϊκό νάτριο) για ξήρανση και τα λιπίδια συμπυκνώνονταν μέχρι ξηρού βάρους με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα. Το εναπομείναν μικροβιακό λίπος ζυγίζοταν (Fakas *et al.*, 2006)

Για την προετοιμασία της στήλης, ζυγίζοταν 10πλάσια ποσότητα silicic acid σε σχέση με το βάρος των λιπιδίων και τοποθετούνταν στο φούρνο (110 °C) για 24 h και έπειτα ακολουθούσε το πακετάρισμα της στήλης με τη χρήση διχλωρομεθανίου. Στη συνέχεια, τα λιπίδια διαλύονταν σε 1-2 mL χλωροφορμίου ή διχλωρομεθανίου και με πιπέτα Pasteur προσθέτονταν στη στήλη.

Έπειτα, προστίθετο στη στήλη χλωροφόρμιο (100 mL χλωροφόρμιο ανά 100 mg λιπιδίων) έτσι ώστε να διαχωριστούν τα ουδέτερα λιπίδια και σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη παραλαμβάνονταν το πρώτο κλάσμα των λιπιδίων που περιέχει τα ουδέτερα λιπίδια (N) (Guo & Otta, 2000; Fakas *et al.*, 2006).

Με τον ίδιο τρόπο, προστίθετο ακετόνη στη στήλη προκειμένου να παραληφθεί το κλάσμα των σφιγγολιπιδίων και των γλυκολιπιδίων (S+G) και τέλος μεθανόλη για να παραληφθεί το κλάσμα των φωσφολιπιδίων (P). Το κλάσμα του διχλωρομεθανίου περιέχει τα ουδέτερα λιπίδια (neutral lipids- NL), το κλάσμα της ακετόνης τα γλυκολιπίδια και σφιγγολιπίδια (glycolipids and phospholipids- G+S) και το κλάσμα της μεθανόλης τα φωσφολιπίδια (phospholipids- P).

Τα κλάσματα αυτά τοποθετούνταν σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες, εξατμίζονταν σε περιστροφικό εξατμιστήρα και στο τέλος υπολογίζοταν το ξηρό βάρος κάθε κλάσματος ως ποσοστό % των συνολικών λιπιδίων.

3.3.9.3 Μεθυλεστεροποίηση.

Ο προσδιορισμός της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια αέριας χρωματογραφίας προϋποθέτει τη μετατροπή των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες, που είναι μόρια περισσότερο πτητικά και λιγότερο πολικά από τα ομόλογα λιπαρά οξέα. Η αντίδραση μεθυλεστεροποίησης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο AFNOR. Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα την αποτροπή δημιουργίας *trans* ισομερών τα οποία δεν απαντούν, υπό φυσιολογικές συνθήκες, στα μικροβιακά λιπίδια. Η μεθυλεστεροποίηση είναι μια μέθοδος η οποία εφαρμόζεται προκειμένου να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων που περιέχονται στο ενδοκυτταρικό λίπος. Το κυτταρικό λίπος μετατρέπεται με μεθυλίωση στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες, με τη γενικευμένη μέθοδο AFNOR (Papanikolaou *et al.*, 2001). Η εστεροποίηση είναι μια διαδικασία που τελείται σε δυο στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο.

Κατά το πρώτο στάδιο, τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων, με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διάλυμα του μεθανολικού νατρίου και παραλαμβάνονται οι αντίστοιχοι σάπωνές τους. Στο δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

Σε σφαιρικές φιάλες που έχουν εξατμιστεί οι διαλύτες και έχει παραμείνει το ζυγισθέν ενδοκυτταρικό λίπος, προστίθεντο 2-3 πέτρες βρασμού και 10 mL μεθανολικού νατρίου (MeO-Na⁺) για κάθε 100mg λίπους.

Στη συνέχεια, το δείγμα τοποθετείται προς βρασμό για 20 min σε κάθετο ψυκτήρα. Μετά το πέρας του χρόνου, προστίθεται στο δείγμα ποσότητα υδροχλωρικής μεθανόλης έτσι ώστε το δείγμα να αποχρωματιστεί και αφήνεται προς βρασμό για άλλα 20 min. Έπειτα, προστίθεται νερό στο δείγμα έτσι ώστε η αντίδραση να λάβει τέλος και το δείγμα μεταφέρεται σε εκχυλιστική χοάνη.

Προστίθενται 6 mL εξανίου και το δείγμα αναδεύεται έντονα και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία έως ότου διαχωριστούν οι δυο φάσεις (η οργανική με το εξάνιο και η υδατική). Η πάνω φάση, που αποτελείται από τους εστέρες των λιπαρών οξέων και το εξάνιο, παραλαμβάνεται σε φιαλίδιο και προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου Na₂SO₄ για απορρόφηση της υγρασίας, ενώ η κάτω φάση απορρίπτεται.

Τα δείγματα που προκύπτουν από τη μεθυλεστεροποίηση, οδηγούνται στον αέριο χρωματογράφο για την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων στα επιμέρους λιπαρά οξέα. Πραγματοποιείται έγχυση 1μL δείγματος με ειδική σύριγγα στην υποδοχή του αέριου χρωματογράφου 8000 series FISIONS.

Οι συνθήκες αέριου χρωματογράφου ήταν:

- 1) Θερμοκρασία εισαγωγέα : 260 °C,
- 2) Θερμοκρασία ανιχνευτή (FID): 260 °C,
- 3) Φέρον αέριο He (ροή 1.38 mL/ min), για ενεργοποίηση φλόγας H₂ (60 kPa), O₂ (110 kPa)
- 4) Τύπος στήλης SP2560 με μήκος 100m x .25mm x .2 mm

Η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 20 min και η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων έγινε με τη βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων μεθυλεστέρων. Η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος στο δείγμα των λιπιδίων υπολογίστηκε με βάση το εμβαδόν της κάθε

κορυφής του αντίστοιχου χρωματογραφήματος και εκφράστηκε ως ποσοστό % του συνόλου των λιπαρών οξέων του δείγματος.

3.3.9.4 Υπολογισμός δείκτη ακορεστότητας λιπαρών οξέων (Unsaturation index-UI).

Αφού ολοκληρώθηκε η ανάλυση των δειγμάτων στον αέριο χρωματογράφο υπολογίστηκε και ο δείκτης ακορεστότητας των λιπαρών οξέων του εκάστοτε δείγματος.

Ως δείκτης ακορεστότητας (Unsaturation index- UI) ορίζεται ο δείκτης που εκφράζει το πόσο ακόρεστο είναι ένα λιπίδιο. Ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι τα οξέα που φέρουν έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς όπως το παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1) και το ελαϊκό οξύ (C18:1) με ένα διπλό δεσμό, το λινελαϊκό οξύ (C18:2) με 2 διπλούς δεσμούς και το γ-λινολενικό οξύ (C18:3) με 3 διπλούς δεσμούς. Όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο περισσότερο ακόρεστα είναι τα λιπίδια και τόσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης ακορεστότητας.

Ο UI των μικροβιακών λιπιδίων υπολογίστηκε ως εξής:

$$UI = \frac{\% \text{ μονοακόρεστα } \Lambda O + 2 * \% \text{ διακόρεστα } \Lambda O + 3 * \% \text{ τριακόρεστα } \Lambda O}{100}$$

Όπου ΛΟ= λιπαρά οξέα.

3.3.10 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε με την ακόλουθη μέθοδο. Έπειτα από την απομάκρυνση των λιπιδίων από τη βιομάζα η βιομάζα άνευ λίπους (Xf) οδηγούνται προς ξήρανση στους 96 °C με στόχο την απομάκρυνση του αντιδραστηρίου χλωροφορμίου (CHCl₃)-μεθανόλης για χρονικό διάστημα 24 h.

Από την εν λόγω βιομάζα 0,05 g ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας (τύπου Sartorius basic), τοποθετούνταν σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναμιγνύονταν με 10 mL HCl (2 M). Ακολουθούσε βρασμός των δειγμάτων στους 100 °C, για 40 min και στη συνέχεια προσθήκη σε αυτά 10 mL NaOH (2 M).

Τα δείγματα στη συνέχεια υφίσταντο διήθηση μέσω διπλού ηθμού Whatman No. 1. Το διήθημα συλλέχτηκε σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες και η συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών προσδιορίστηκε με τη χρήση της μεθόδου του δινιτροσαλικυλικού οξέος DNS όπως περιγράφεται σε προηγούμενο εδάφιο (παράγραφος 3.3.3) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/L καθώς και σε ποσοστό % των ενδοπολυσακχαριτών επί της παραγόμενης βιομάζας (IPS/X, %).

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των ενδοπολυσακχαριτών ακολουθήσε η ανάλυση των άνω δειγμάτων με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) σε σύστημα Waters 600E, όπως περιγράφεται σε προηγούμενο εδάφιο (παράγραφος 3.3.4) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ποσοστό % επί της συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών για κάθε σημείο της κινητικής.

4. Αποτελέσματα.

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η μελέτη της βιοφυσιολογικής συμπεριφοράς του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* (κινητική της αύξησης του μύκητα, κατανάλωσης των υποστρωμάτων) και της βιοσύνθεσης ενδοκυτταρικού λίπους καθώς και η διερεύνηση της σύστασης των μικροβιακών λιπιδίων, η ανάλυση των λιπιδίων σε κλάσματα αυτών, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και του είδους των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών, μέτρηση της ενεργότητας της εξοκυτταρικής ιμπερτάσης και ο προσδιορισμός του βαθμού αποχρωματισμού του αποβλήτου ή του συνδυασμού αυτών, κατά την καλλιέργεια του σε ανανεώσιμες πηγές ενέργειας.

Συγκεκριμένα, τα υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν η σουκρόζη, η γλυκερόλη και η μελάσα, καθώς και μίγμα γλυκερόλης – μελάσας. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με υπόστρωμα μελάσας (50 g/L) με προσθήκη αζώτου το θειϊκό αμμώνιο [(NH₄)₂SO₄] ως ανόργανη πηγή αζώτου, το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) και η πεπτόνη ως οργανική πηγή αζώτου με συνδυασμούς Peptone 2 g/L & yeast extract 1 g/L, Yeast extract 1 g/L και προσθήκη [(NH₄)₂SO₄] σε συγκέντρωση η οποία προσέφερε το αντίστοιχο ποσοστό αζώτου με την προθήκη Peptone 2 g/L, και χωρίς προσθήκη Peptone ή yeast extract ή [(NH₄)₂SO₄]. Όμως όσο αφορά την προσθήκη πηγής αζώτου δεν πραγματοποιήθηκε σε καμία ζύμωση προσθήκη yeast extract, πεπτόνης και (NH₄)₂SO₄ λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη του αποβλήτου μελάσα πλην της ζυμώσεως στην οποία ως υπόστρωμα ήταν αποκλειστικά η σουκρόζη.

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να στραφεί ο μεταβολισμός προς παραγωγή μικροβιακού λίπους επομένως ο λόγος C/N έπρεπε να είναι όσος το δυνατό υψηλότερος προκειμένου να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Η συγκεκριμένη μελάσα αγνώστου προελεύσεως, όπως ήδη αναφέρθηκε, ήταν πλούσια σε άζωτο. Η επιπλέον προσθήκη αζώτου στο συγκεκριμένο υπόστρωμα οδήγησε στην αυξημένη παραγωγή βιομάζας λειτουργώντας αρνητικά στην λιποσυσσώρευση και διατηρώντας τον λόγο C/N σε χαμηλά επίπεδα.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 6 ζυμώσεις βυθού με τις εξής αρχικές συγκεντρώσεις συνολικών σακχάρων (TS₀) ως πηγής άνθρακα: 50 g/L, 80 g/L, 100 g/L και 120 g/L όταν η μελάσα χρησιμοποιήθηκε ως μοναδική πηγή άνθρακα, 50 g/L σουκρόζη και TS₀:50 g/L μελάσα :40 g/L γλυκερόλη προκειμένου να ανέλθει ο λόγος C/N σε υψηλότερα επίπεδα για να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία ο εν λόγω μύκητας κατά την καλλιέργεια του σε συνθήκες που ευνοούν την υψηλή συγκέντρωση μικροβιακού λίπους (καλλιέργεια σε ζυμώσεις βυθού με υψηλό λόγο C/N), δύναται να συσσωρεύσει λίπος σε υψηλές συγκεντρώσεις, στο οποίο περιέχεται σε ποικίλα ποσά το λιπαρό οξύ γ-λινολενικό (GLA).

Στη συνέχεια, παρατίθεται ο συνοπτικός πίνακας (Πίνακας 4) επιλεγμένων σημείων της κινητικής για κάθε ένα από τα προαναφερθέντα υποστρώματα και του μίγματος τους, στα οποία παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη συσσώρευση μικροβιακού λίπους (L_{max}), βιομάζας (X) καθώς και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) από το μύκητα *Thamnidium elegans*. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μύκητας αναπτύχθηκε ικανοποιητικά σε όλα τα υποστρώματα και παρουσίασε σημαντική κυτταρική αύξηση, ενώ η ποσότητα του ενδοκυτταρικού λίπους που παρήχθη ήταν ιδιαίτερος υψηλή σε

ορισμένες περιπτώσεις (3,5–13,3 g/L). Ως καταλληλότερο υπόστρωμα για την αύξηση του μύκητα φαίνεται να είναι ο συνδιασμός μελάσας-γλυκερόλης, αφού η ποσότητα της βιομάζας που παρήχθη έφτασε τα 29,42 g/L και σημειώθηκε η μεγαλύτερη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (13,31 g/L).

Πίνακας 4. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε ανανεώσιμα υποστρώματα με πηγές άνθρακα τη σουκρόζη, τη μελάσα, καθώς και μίγμα γλυκερόλης – μελάσας.

Υπόστρωμα (g/L)	Χρόνος (h)	So (g/L)	Scon (g/L)	Pro (g/L)	Prcon (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	Xf (g/L)	IPS (g/L)	Y _{LX} (%)	Y _{IPS/X} (%)
Μελάσα TS0: 50 g/L	63	50,5	37,96	10	1,6	20,52	2,03	18,49	4,94*	9,90	24,06
	87		39		2,2	20,72	3,49*	17,23	3,69	16,85	17,82
	102		43,68		2,2	21,82*	2,54	19,28	2,41	11,63	11,03
Σακχαρόζη TS0: 50 g/L	90	48,8	44,5	-	-	19,62*	7,67*	11,95	2,76*	39,08	14,08
Μελάσα TS0: 80 g/L	140	77,0	72,7	14,9	4,6	31,86*	11,64*	20,22	3,03*	36,52	9,50
Μελάσα TS0: 100 g/L	207	101,9	42,1	25,5	11,3	31,34*	3,96	27,38	7,37*	12,65	23,51
	251		42,1		11,4	28,94	4,41*	24,53	6,26	15,22	21,64
Μελάσα TS0: 120 g/L	271	121,2	24,45	31,8	15,87	22,62*	3,28*	19,34	4,39*	14,49	19,42
TS0: 50 g/L Μελάσα : 40 g/L Γλυκερόλη	260	GloI: 38 Mol: 52	GloI: 21,78 Mol:47	11,3 1	2,44	28,36	13,31*	15,05	4,17*	46,9	14,7
	358		GloI: 34,48 Mol: 47,3		4,02	29,42*	11,38	18,04	3,45	38,7	11,7

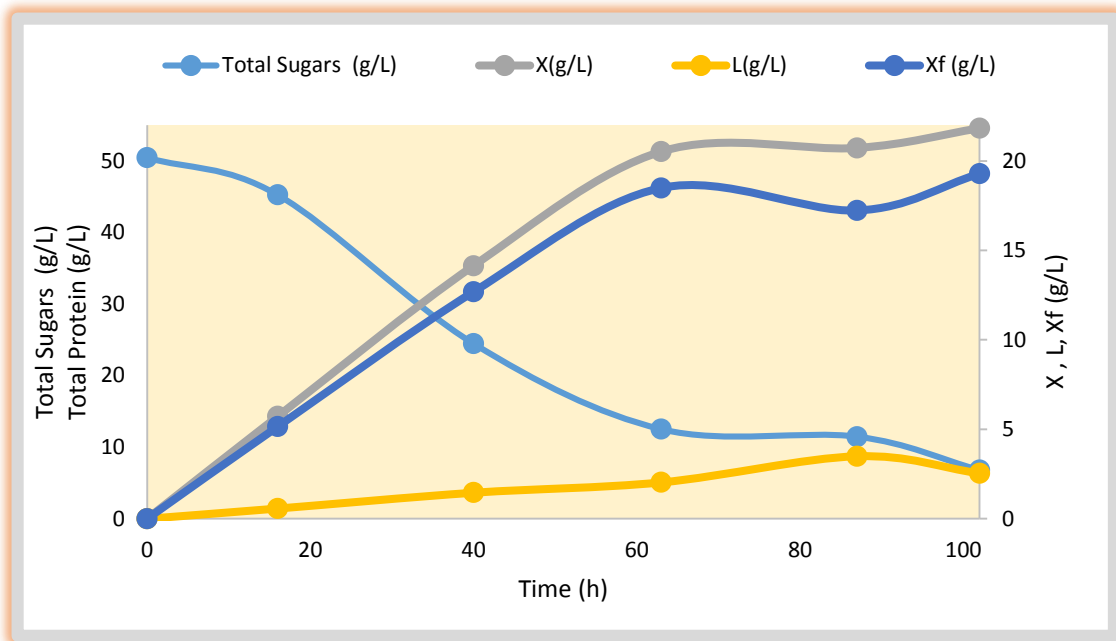
Οι τιμές με * αντιστοιχούν στις μέγιστες συγκεντρώσεις.

TS0: Αρχική συγκέντρωση συνολικών σακχάρων βιομετατροπής

4.1. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας (TS₀=50 g/L).

4.1.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.

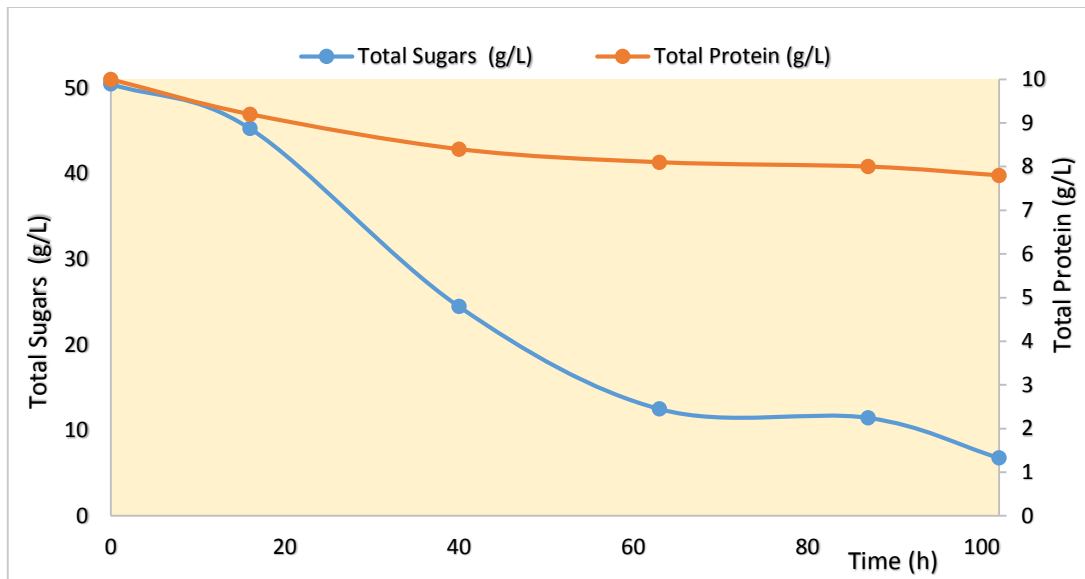
Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=50 g/L) απεικονίζεται στο γράφημα 4.1.1.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει σημαντική κυτταρική αύξηση με μέγιστη παραγωγή βιομάζας 21,82 g/L περί τις 102 h.



Γράφημα 4.1.1α Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της κατανάλωσης σακχάρων υποστρώματος, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, και της ελεύθερης λίπους βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα.
 Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS₀ =50 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =10 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και πραγματοποιείται εξάντληση της πηγής άνθρακα από τις 102 h. Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους από τον εν λόγω μύκητα στο παρόν υπόστρωμα δεν χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα υψηλή και έχει μέγιστη τιμή 3,49 g/L, με συντελεστή απόδοσης Y_{L/X} περί του 17% (0.17 g λίπους ανά g παραγόμενης βιομάζας). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο χαμηλό λόγο C/N=24 mol/mol λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του υποστρώματος σε πρωτεΐνη περί των 10 g/L.

Παράλληλα με την κατανάλωση των σακχάρων εκ του υποστρώματος παρατηρείται και ταυτόχρονη κατανάλωση της πρωτεΐνης που περιέχει η μελάσα (Γράφημα 4.2.1β). Στις 102 h η συνολική κατανάλωση πρωτεΐνης από τον μικροοργανισμό ανέρχεται στα 2,2 g/L ενώ μετά το πέρας των 102 h η συγκέντρωση των σακχάρων του υποστρώματος έχει κατέλθει στα 5 g/L με αποτέλεσμα να αδυνατεί να καλύψει τις βιοσυνθετικές απαιτήσεις σε ενέργεια του μικροοργανισμού και να παρατηρείται μείωση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους.



Γράφημα 4.3.1.β. Κινητική της εξέλιξης της κατανάλωσης σακχάρων υποστρώματος και της κατανάλωσης πρωτεΐνης, συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία $T=27\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS₀ =50 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =10 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κατ' ουσία δεν εμφανίστηκε σημαντική συσσώρευση λίπους εντός των μυκηλιακών δομών (το μέγιστο λίπος επί ξηράς μάζας Y_{LX} δεν ξεπέρασε την τιμή του 17% ενώ οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί συσσωρεύουν λίπος με Y_{LX} μεγαλύτερο του 20% (Ratledge, 1994; Ratledge *et al.*, 2005; Αγγελής, 2007) και παρατηρήθηκε ανακατανάλωση των μικροβιακών λιπιδίων κατά το τέλος της ζύμωσης. Το φαινόμενο της αποικοδόμησης των ενδοκυτταρικών λιπαρών οξέων κατά την εξάντληση ενός συστατικού στο υπόστρωμα έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις (Aggelis & Sourdís, 1997, Papanikolaou *et al.*, 2001; 2004; 2007; Fakas *et al.*, 2007; 2008).

Δεδομένου του γεγονότος μια τυπική πρωτεΐνη, όπως και η σακχαρόζη που αποτελεί το κύριο συστατικό της μελάσας, περιέχει 40 % w/w άνθρακα (Αγγελής, 2007), σε ό,τι αφορά το ποσοστό του άνθρακα μπορεί να θεωρηθεί κατά προσέγγιση ότι 1 g αναλωθείσης πρωτεΐνης αντιστοιχεί με 1 g αναλωθείσης σακχαρόζης. Έτσι, κατά την πραγματοποιηθείσα βιομετατροπή ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας - υποστρώματος ήταν της τάξης των 0.48 g παραγόμενης ξηράς βιομάζας ανά 1 g καταναλισκομένου ισοδυνάμου σακχάρου ($Y_{XS}=48\%$).

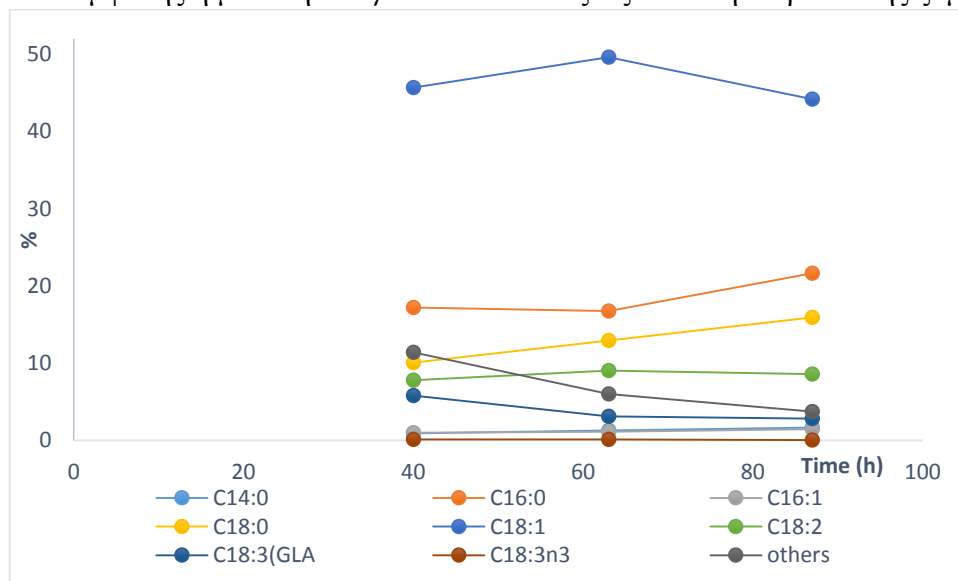
Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε σε επιλεγμένα της συγκεκριμένης βιομετατροπής. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 4.1.1.

Πίνακας 4.1.1. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας (50 g/L). Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS0 =50 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =10 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

Time (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3(GLA)	C18:3n3	others	(UI)
40	0,92	17,22	1	10,07	45,69	7,79	5,8	0,11	11,39	0,8
63	1,27	16,75	1,13	12,94	49,63	9,03	3,11	0,12	6,02	0,79
87	1,67	21,63	1,45	15,9	44,17	8,59	2,82	0,06	3,71	0,71

Τα ολικά λιπίδια του υπό μελέτη μύκητα περιείχαν λιπαρά οξέα με 10 έως 24 άτομα άνθρακα τα κυριότερα από τα οποία ήταν τα κορεσμένα το μυριστικό (C14:0), παλμιτικό (C16:0) και στεατικό (C18:0), το μονοακόρεστο ελαϊκό (C18:1) που ήταν και το μείζον συστατικό και τα πολυακόρεστα λινελαϊκό (C18:2) και γ-λινολενικό (GLA). Σε χαμηλότερα ποσοστά βρέθηκαν βρέθηκαν οξέα όπως, παλμιτελαϊκό, αραχιδικό και σε ορισμένες περιπτώσεις βαζενικό και εικοσιδυοενοϊκό. Από τον πίνακα 4.1.1. βλέπουμε με την εξέλιξη της ζύμωσης το ποσοστό του γ-λινολενικού πέφτει με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού του μυριστικού (C14:0), παλμιτικού (C16:0) και στεατικού(C18:0) οξέος. Το ποσοστό του γ-λινολενικού παρουσιάζει την μέγιστη συγκέντρωση (5,8%) στις 40 h. Την ίδια περίπου εξέλιξη με το γ-λινολενικό οξύ παρουσιάζει και το λινελαϊκό οξύ (C18:2). Τέλος υπολογίστηκε δείκτης ακορεστότητας (UI). Όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο περισσότερο ακόρεστα είναι τα λιπίδια και τόσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης ακορεστότητας. Στον πίνακα 4.1.1 φαίνεται ότι κατά την εξέλιξη της βιομετατροπής μειώνεται η ακορεστότητα των λιπιδίων εξαιτίας της μείωσης του ελαϊκού (C18:1), του λινελαϊκού (C18:2) και του γ-λινολενικού οξέος (C18:3).

Η απεικόνιση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%) του μύκητα *T. elegans* στο υπόστρωμα της μελάσας φαίνεται στο γράφημα 4.1.1.γ. Στο γράφημα αυτό είναι εμφανής η μείωση του γ-λινολενικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

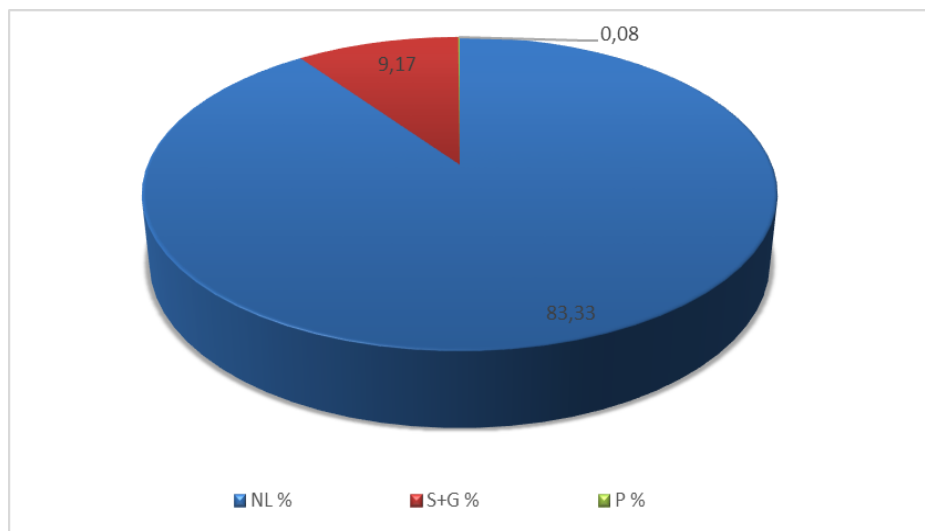


Γράφημα 4.1.1.γ Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%): Μυριστικό οξύ (C14:0), Παλμιτικό οξύ (C16:0), Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), Στεατικό οξύ (C18:0), Ελαϊκό οξύ (C18:1), Λινελαϊκό οξύ (C18:2) α-λινολενικό (C18:3n3) και γ-λινολενικό οξύ (C18:3n6) και λοιπών οξέων, του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες

(150 g/m) και θερμοκρασία $T=27\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση μελάσας ($TS_0=50\text{ g/L}$) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =10 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Εκτός από την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%), πραγματοποιήθηκε στο στάδιο αυτό η ανάλυση του μικροβιακού λίπους στα επιμέρους κλάσματα των ουδέτερων λιπιδίων, των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων.

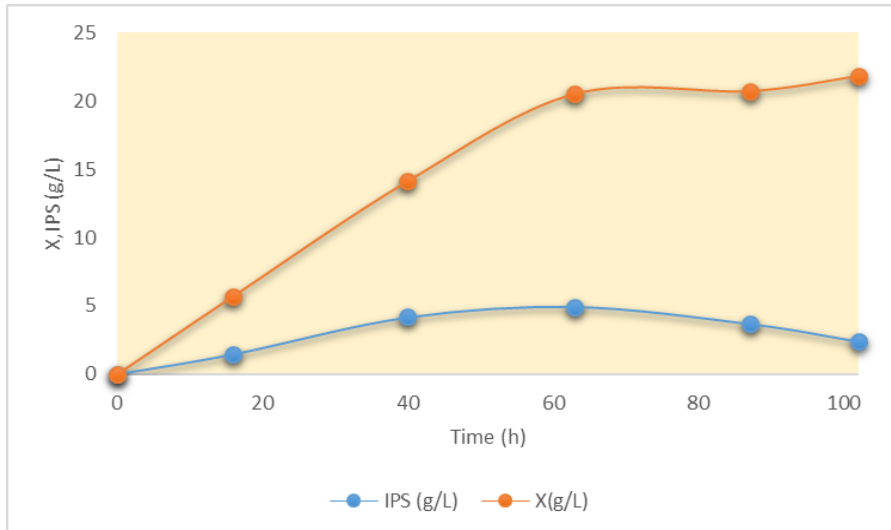
Το γράφημα 4.1.1.δ. παρουσιάζει τα ποσοστά των κλασμάτων επί των ολικών λιπιδίων στις 102 h της βιομετατροπής. Από το γράφημα αυτό είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό επί του συνόλου των λιπιδίων (TFA), ενώ τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (S+G) και ιδιαίτερα τα φωσφολιπίδια (P) απαντώνται σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό ($P=0,08\%$). Επομένως η περιεκτικότητα του μυκηλίου σε λιπίδια έδειξε ότι τα ουδέτερα λιπίδια ήταν το κυρίαρχο λιπιδιακό κλάσμα σε σχέση με τα πολικά λιπίδια (γλυκολιπίδια, σφιγγολιπίδια και φωσφολιπίδια).



Γράφημα 4.1.1.δ. Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TFA) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα στην χρονική περίοδο των 102 h της βιομετατροπής. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 g/m) και θερμοκρασία $T=27\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση μελάσας ($TS_0=50\text{ g/L}$) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =10 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

4.1.2. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου και ανά μονάδα βιομάζας.

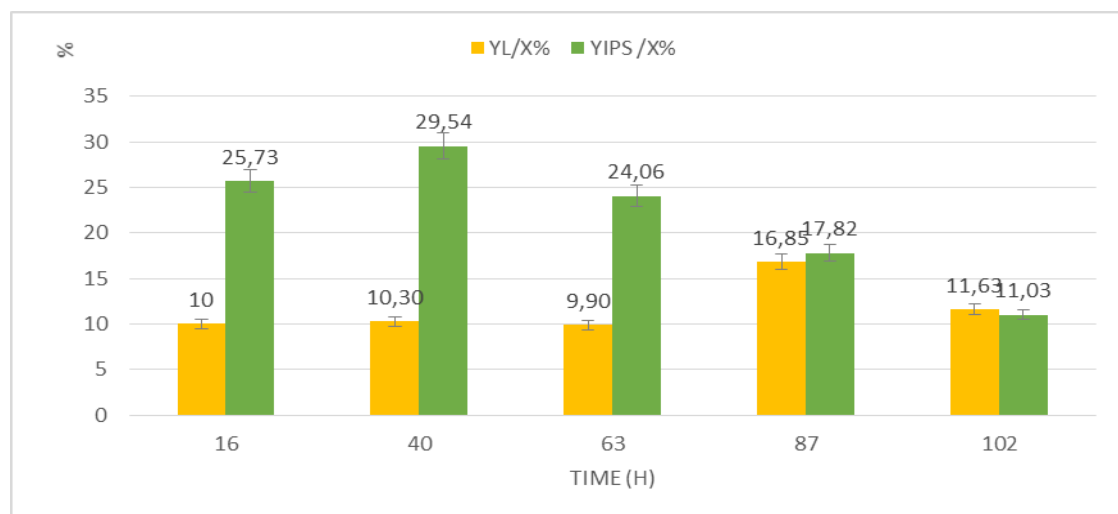
Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Η κινητική μελέτης στην συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών και της παραγόμενης βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα ($TS_0=50\text{ g/L}$) απεικονίζεται στο γράφημα 4.1.2.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει σημαντική παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών με μέγιστη συγκέντρωση 4,94 g/L περί τις 63 h.



Γράφημα 4.1.2.α Κινητική μελέτης στις συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών και της παραγόμενης βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα ($S_0=50$ g/L). Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία $T=27$ °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας ($TS_0=50$ g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =10 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα της άνω κινητικής η παραγωγή IPS σε g/L αυξανόταν συνεχώς μέχρι τις 63 h της βιομετατροπής έπειτα όμως από το πέρας του εν λόγω χρονικού διαστήματος παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσής τους, προς το τέλος της βιομετατροπής γεγονός που πιθανόν συνδέεται με την μείωση της συγκέντρωσης σακχάρων του υποστρώματος στο μέσο καλλιέργειας τα οποία δεν επαρκούσαν πλέον για να καλύψουν τις βιοσυνθετικές ανάγκες του μικροοργανισμού.

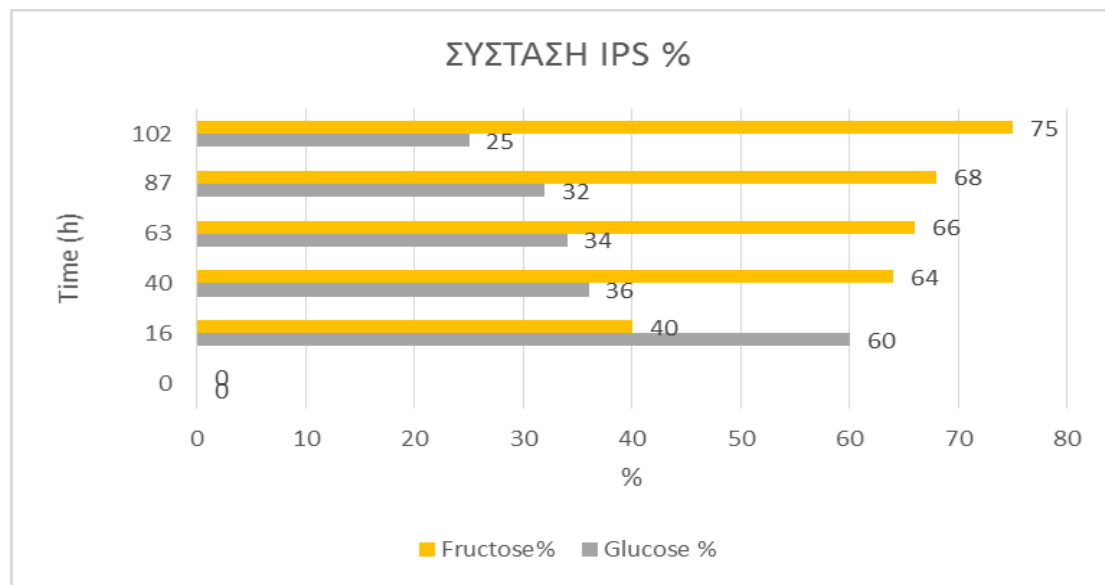
Επίσης η ποσότητα των ενδοπολυσακχαριτών ανα μονάδα βιομάζας ($Y_{IPS}/X\%$, w/w) αρχικά αυξανόταν με το χρόνο καλλιέργειας *Thamnidium elegans* στη συνέχεια όμως υπήρξε μείωση-ανακατανάλωση των ήδη ενδοπολύσακχαριτών. Συγκρίνοντας τον συντελεστή απόδοσης παραγόμενων IPS ($Y_{IPS}/X\%$) και τον αντίστοιχο του ενδοκυτταρικού λίπους ($Y_L/X\%$) ως προς την παραγόμενη βιομάζα είναι εμφανές ότι η μείωση του $Y_{IPS}/X\%$ συνοδεύθηκε από ταυτόχρονη αύξηση του $Y_L/X\%$ ο οποίος έλαβε την μέγιστη τιμή του στις 87h της βιομετατροπής.



Γράφημα 4.1.2.β Συντελεστής απόδοσης IPS, Y_{IPS} (% και ενδοκυτταρικού λίπους (YL (%)) ως προς την παραγόμενη βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (S₀=50 g/L). Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (S₀ =50 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =10 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

Σε επόμενο στάδιο έγινε ανάλυση των ενδοπολυσακχαριτών με στόχο την ανίχνευση των δομικών τους μονάδων. Η μελέτη των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ολοκληρώθηκε με τον ποιοτικό προσδιορισμό τους σε κάθε σημείο της κινητικής και παρουσιάζεται στο γράφημα 4.1.2.γ. Στα αρχικά στάδια της βιομετατροπής στη συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών υπερέχει η μορφή γλυκόζης ενώ η συσσώρευση της φρουκτόζης παρατηρείται σε μικρότερο ποσοστό.

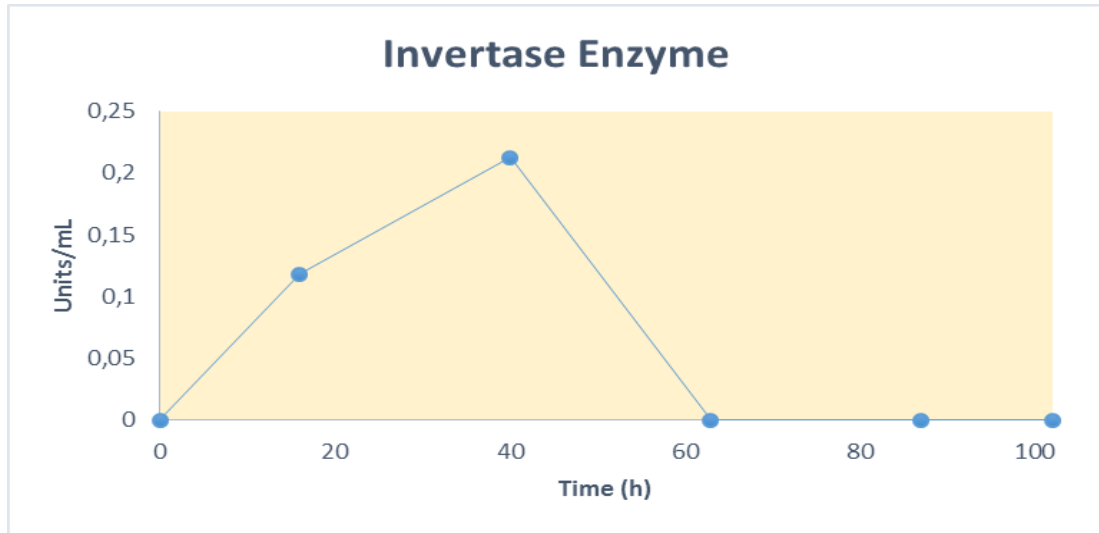
Καθίσταται εμφανές όμως, ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρατηρείται μείωση του μονοσακχαρίτη γλυκόζη και ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης του μονοσακχαρίτη φρουκτόζη. Είναι εμφανές το γεγονός της <<κινητικότητας>> των ενδοκυτταρικών μονοσακχαριτών τα οποία συνιστούσαν τις δομές των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής σε συνάρτηση με το χρόνο.



Γράφημα 4.1.2.γ Ποιοτικός προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS) σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα .Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS₀ =50 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =10 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες

4.1.3. Προσδιορισμός ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμβεργτάσης.

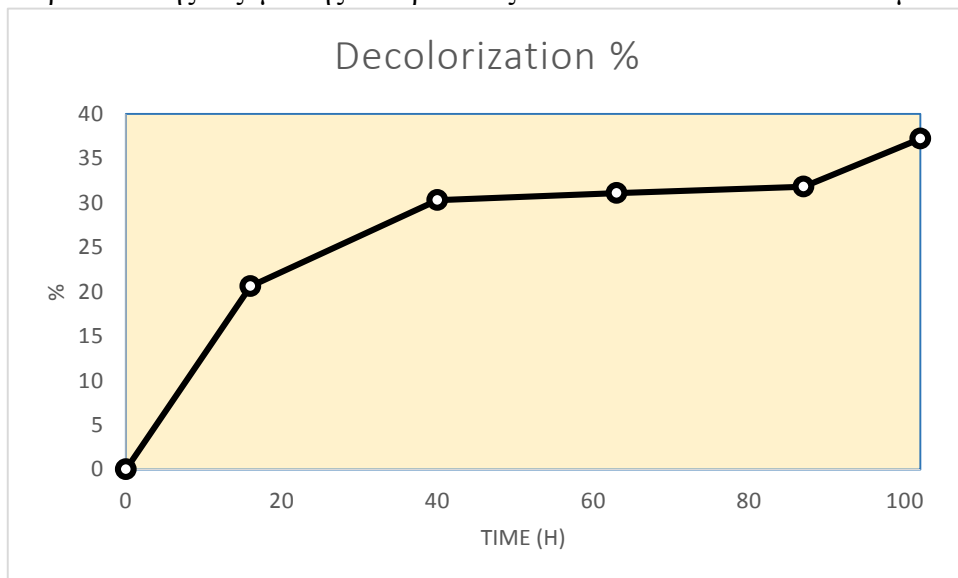
Κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=50 g/L) πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβεργτάσης ο οποίος απεικονίζεται στο γράφημα 4.1.3. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα 0,21U/mL περί τις 40 h.



Γράφημα 4.1.3. Προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium Elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS0 =50 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =10 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

4.1.4. Προσδιορισμός βαθμού αποχρωματισμού υποστρώματος.

Τέλος πραγματοποιήθηκε μέλετη της εξέλιξης του αποχρωματισμού του θρεπτικού μέσου. Κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής παρατηρήθηκε αποχρωματισμός του μέσου με μέγιστο ποσοστό 37,2% περί των 102h. Το γεγονός αυτό δείχνει την ικανότητα στου στελέχους *Thamnidium elegans* να διασπάει τις μελανοιδίνες καθώς και υπολοιπες χρωστικές ουσίες του υποστρώματος. Η εξέλιξη του αποχρωματισμού του μέσου καλλιέργειας με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS0=50 g/L) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρουσιάζεται αναλυτικά στο επόμενο γράφημα.



Γράφημα 4.1.4 Η εξέλιξη του αποχρωματισμού του μέσου καλλιέργειας του μύκητα *Thamnidium Elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS0 =50 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =10 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

4.2. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα σακχαρόζης (TS₀=50 g/L)

4.2.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη (εμπορική σακχαρόζη προερχόμενη από την Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης) (TS₀=50 g/L) απεικονίζεται στο γράφημα 4.2.1.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει σημαντική κυτταρική αύξηση με μέγιστη παραγωγή βιομάζας 19,62 g/L περί τις 90 h.

Η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και πραγματοποιείται εξάντληση της πηγής άνθρακα από τις 114 h. Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους από τον εν λόγω μύκητα στο παρόν υπόστρωμα χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα υψηλή σε σχέση με την καλλιέργεια του ίδιου στελέχους σε 50 g/L υπόστρωμα μελάσας (όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο εδάφιο 4.1.1).

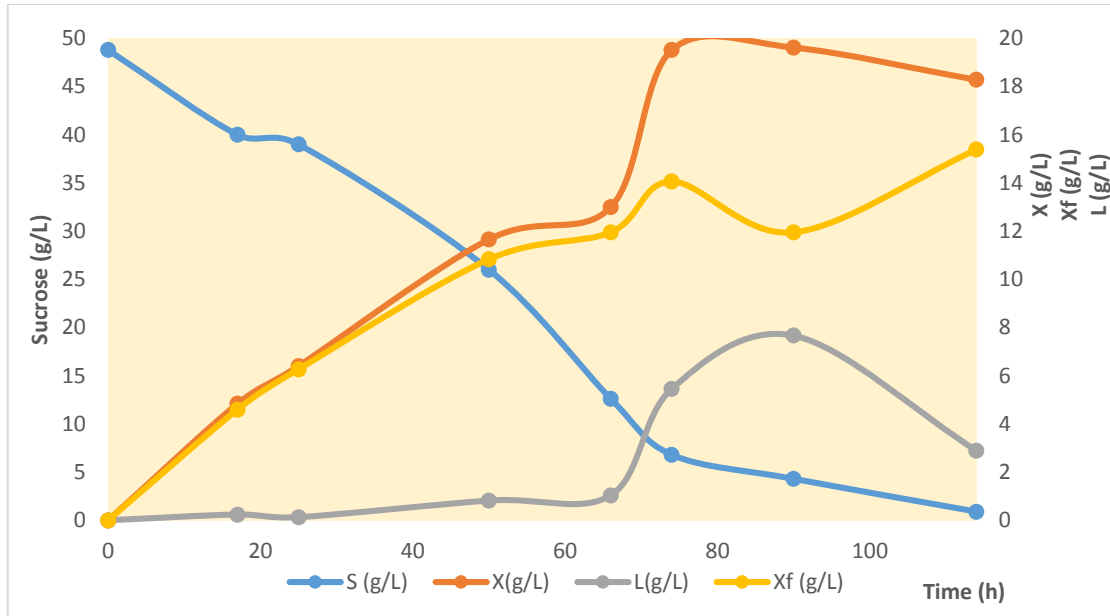
Η συγκέντρωση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους λαμβάνει μέγιστη τιμή 7,67 g/L, με συντελεστή απόδοσης (Y_{LX}) 39% (0.39 g λίπους ανά g παραγόμενης βιομάζας). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο λόγο C/N της παρούσας βιομετατροπής (C/N=125 mol/mol) ο οποίος κρίνεται υψηλότερος από τον αντίστοιχο της καλλιέργειας του ίδιου στελέχους σε 50 g/L υπόστρωμα μελάσας το οποίο χαρακτηριζόταν από υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη 10 g/L (εδάφιο 4.1.1).

Στη παρούσα βιομετατροπή έλαβε χώρα η προσθήκη πηγής αζώτου υπό τη μορφή yeast extract (1g/L) και 0,56g [(NH₄)₂SO₄] ποσότητα που αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του ελεύθερου αζώτου που διαθέτουν τα TS₀:50 g/L μελάσας (c=251mg/L).

Μετά το πέρας των 114 h η συγκέντρωση των σακχάρων του υποστρώματος έχει κατέλθει στα 0,9 g/L με αποτέλεσμα να αδυνατεί να καλύψει τις βιοσυνθετικές απαιτήσεις σε ενέργεια του μικροοργανισμού και να παρατηρείται σημαντική μείωση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους. Καθίσταται επομένως εμφανής η ανακατανάλωση των μικροβιακών λιπιδίων κατά το τέλος της ζύμωσης. Το φαινόμενο της αποικοδόμησης των ενδοκυτταρικών λιπαρών οξέων κατά την εξάντληση ενός συστατικού στο υπόστρωμα έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις (Aggelis & Sourdis, 1997; Papanikolaou *et al.*, 2001; 2004; 2007; Fakas *et al.*, 2007; 2008; Papanikolaou & Aggelis, 2010; 2011a;b).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι εμφανίστηκε σημαντική συσσώρευση λίπους εντός των μυκηλιακών δομών (το μέγιστο λίπος επί ξηράς μάζας Y_{LX} ξεπέρασε την τιμή του 39 % ενώ οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί συσσωρεύουν λίπος με Y_{LX} μεγαλύτερο του 20% (Ratledge, 1994; Ratledge *et al.*, 2005; Αγγελής, 2007).

Κατά την πραγματοποιηθείσα βιομετατροπή ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας - υποστρώματος ήταν της τάξης των 0.43 g παραγόμενης ξηράς βιομάζας ανά 1 g καταναλισκόμενου σακχάρου (Y_{x/s}=43%). Επιπλέον στο γράφημα 4.2.1.α απεικονίζεται η εξέλιξη της κινητικής της βιομάζας άνευ λίπους (X_f) σε συνάρτηση με το χρόνο της βιομετατροπής.



Γράφημα 4.2.1α Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της κατανάλωσης σακχάρων εκ του υποστρώματος, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, και της ελεύθερης λίπους βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με την εμπορική σακχαρόζη ως μόνη πηγή άνθρακα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης (TS0 =50 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε σε επιλεγμένα της συγκεκριμένης βιομετατροπής. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 4.2.1.

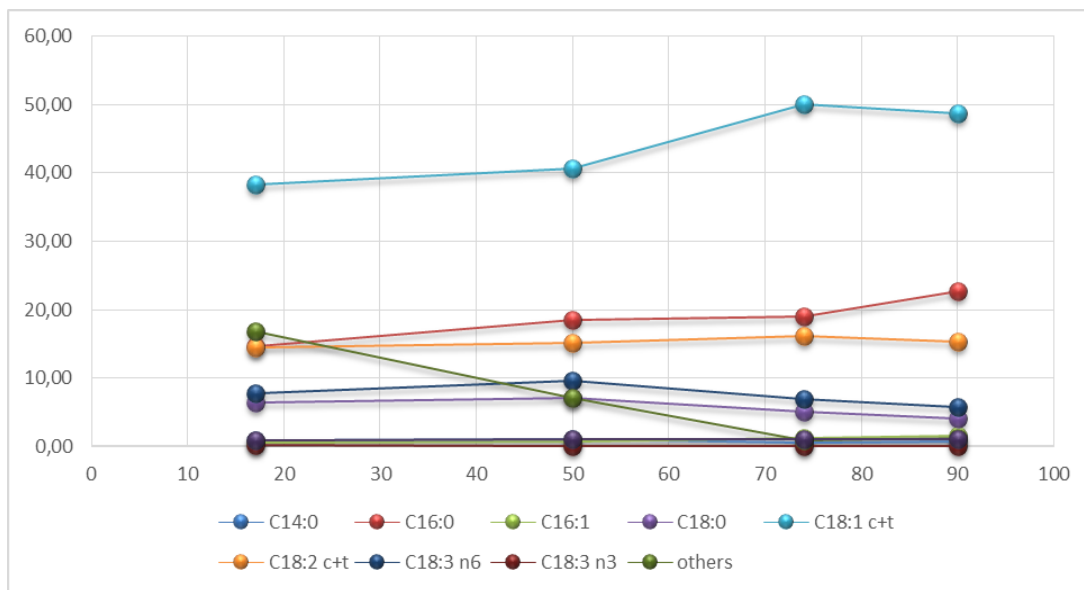
Πίνακας 4.2.1. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα σουκρόζης . Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σουκρόζης (TS0 =50 g/L) υπό αερόβιες συνθήκες.

time (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 c+t	C18:2 c+t	C18:3 n6	C18:3 n3	others	UI
17	0,82	14,58	0,56	6,43	38,33	14,55	7,71	0,22	16,80	0,92
50	1,04	18,58	0,81	7,05	40,66	15,16	9,55	0,06	7,08	1,01
74	0,60	19,01	1,15	5,15	49,94	16,23	6,92	0,01	0,98	1,04
90	0,81	22,62	1,52	4,03	48,70	15,37	5,74	0,01	1,19	0,98

Τα ολικά λιπίδια του υπό μελέτη μύκητα περιείχαν λιπαρά οξέα με 10 έως 24 άτομα άνθρακα τα κυριότερα από τα οποία ήταν τα κορεσμένα το μυριστικό (C14:0), παλμιτικό (C16:0) και στεατικό (C18:0), το μονοακόρεστο ελαϊκό (C18:1) που ήταν και το μείζον συστατικό και τα πολυακόρεστα λινελαϊκό (C18:2) και γ-λινολενικό (GLA C18:3 n6). Σε χαμηλότερα ποσοστά βρέθηκαν βρέθηκαν οξέα όπως, παλμιτελαϊκό, αραχιδικό και σε ορισμένες περιπτώσεις βαξενικό και εικοσιδυοενοϊκό. Από τον πίνακα 4.2.1. βλέπουμε με την εξέλιξη της ζύμωσης το ποσοστό του γ-λινολενικού μειώνεται με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού του παλμιτικού (C16:0) οξέος. Το ποσοστό του γ-λινολενικού παρουσιάζει την μέγιστη συγκέντρωση (9,55%) επί των συνολικών λιπαρών οξέων στις 50 h. Τέλος υπολογίστηκε δείκτης

ακορεστότητας (UI). Όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο περισσότερο ακόρεστα είναι τα λιπίδια και τόσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης ακορεστότητας. Στον πίνακα 4.2.1 φαίνεται ότι κατά την εξέλιξη της βιομετατροπής από τις 74h έως τις 90h μειώνεται η ακορεστότητα των λιπιδίων εξαιτίας της μείωσης του ελαϊκού (C18:1), του λινελαϊκού (C18:2), του λινολενικού(C18:3n3),και του γ-λινολενικού οξέος (C18:3n6).

Η απεικόνιση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%) του μύκητα *T. elegans* στο υπόστρωμα της σακχαρόζης φαίνεται στο γράφημα 4.2.1.β. Στο γράφημα αυτό είναι εμφανής η αυξομείωση του γ-λινολενικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης καθώς και η σημαντική μείωση του συνόλου των λοιπών λιπαρών οξέων κρίνεται αξιοσημείωτη.

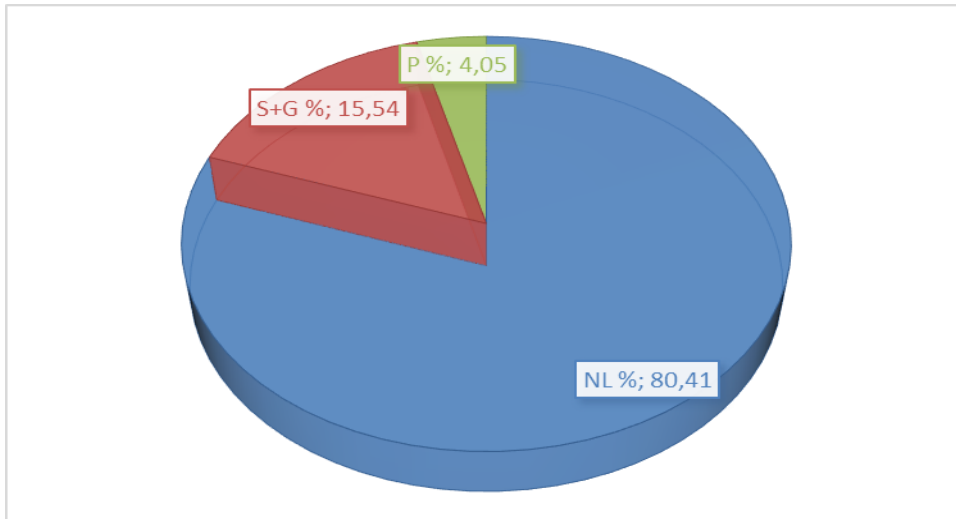


Γράφημα 4.2.1.β Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%): Μυριστικό οξύ (C14:0), Παλμιτικό οξύ (C16:0), Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), Στεατικό οξύ (C18:0), Ελαϊκό οξύ (C18:1), Λινελαϊκό οξύ (C18:2) α-λινολενικό (C18:3n3) και γ-λινολενικό οξύ (C18:3n6) και λοιπών οξέων, του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη σακχαρόζη ως μόνη πηγή άνθρακα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης (TS₀ =50 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Εκτός από την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%), πραγματοποιήθηκε στο στάδιο αυτό η ανάλυση του μικροβιακού λίπους στα επιμέρους κλάσματα των ουδέτερων λιπιδίων, των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων.

Το γράφημα 4.2.1.γ. παρουσιάζει τα ποσοστά των κλασμάτων επί των ολικών λιπιδίων στις 90 h της βιομετατροπής. Από το γράφημα αυτό είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό επί του συνόλου των λιπιδίων (TFA), ενώ τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (S+G) και ιδιαίτερα τα φωσφολιπίδια (P) απαντώνται σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό (P=4,05%).

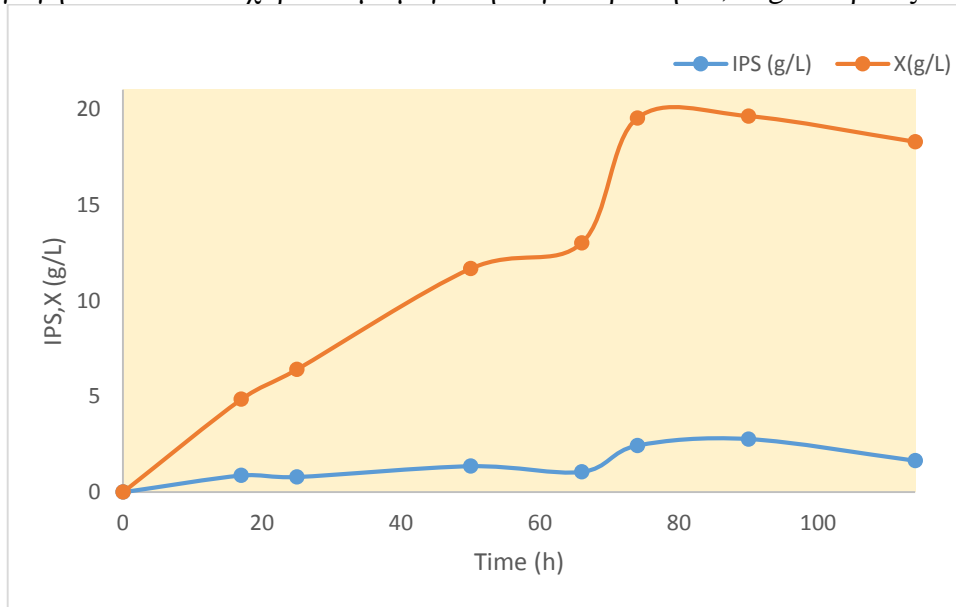
Επομένως η περιεκτικότητα του μυκηλίου σε λιπίδια έδειξε ότι τα ουδέτερα λιπίδια ήταν το κυρίαρχο λιπιδιακό κλάσμα σε σχέση με τα πολικά λιπίδια (γλυκολιπίδια, σφιγγολιπίδια και φωσφολιπίδια).



Γράφημα 4.2.1.γ. Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TFA) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη σακχαρόζη ως μόνη πηγή άνθρακα στην χρονική περίοδο των 90 h της βιομετατροπής. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης (S₀ =50 g/L) υπό αερόβιες συνθήκες.

4.2.2.Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου και ανά μονάδα βιομάζας.

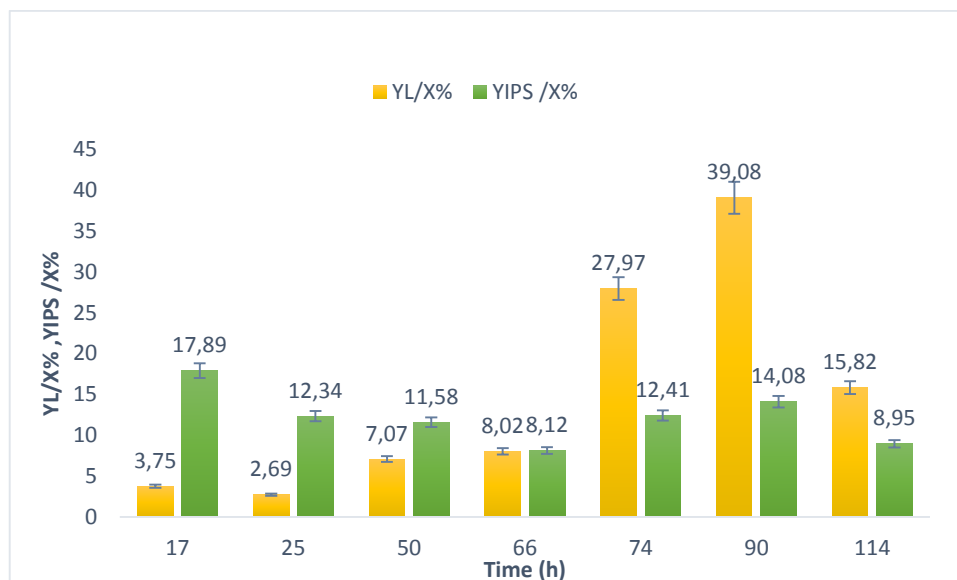
Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Η κινητική μελέτης στις συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών και της παραγόμενης βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη (S₀=50 g/L) απεικονίζεται στο γράφημα 4.2.2.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών με μέγιστη συγκέντρωση 2,76 g/L περί τις 90 h.



Γράφημα 4.2.2.α Κινητική μελέτης στις συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών και της παραγόμενης βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη (TS₀=50 g/L). Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, υπό αερόβιες συνθήκες.

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα της άνω κινητικής η παραγωγή IPS σε g/L αυξανόταν συνεχώς μέχρι τις 90 h της βιομετατροπής έπειτα όμως από το πέρας του εν λόγω χρονικού διαστήματος παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσής τους, προς το τέλος της βιομετατροπής γεγονός που πιθανόν συνδέεται με την μείωση της συγκέντρωσης σακχάρων του υποστρώματος στο μέσο καλλιέργειας τα οποία δεν επαρκούσαν πλέον για να καλύψουν τις βιοσυνθετικές ανάγκες του μικροοργανισμού.

Επίσης η ποσότητα των ενδοπολυσακχαριτών ανα μονάδα βιομάζας ($Y_{IPS/X} \%$, w/w) αρχικά αυξανόταν με το χρόνο καλλιέργειας *Thamnidium elegans*, λαμβάνοντας μέγιστη τιμή 17,89% στις 17h. Στη συνέχεια όμως παρατηρήθηκε μείωση-ανακατανάλωση των ήδη συσσωρευμένων ενδοπολυσακχαριτών. Συγκρίνοντας τον συντελεστή απόδοσης των IPS ($Y_{IPS/X} \%$) και τον αντίστοιχο του ενδοκυτταρικού λίπους ($Y_L/X \%$) ως προς την παραγόμενη βιομάζα (Γράφημα 4.2.2.β) είναι εμφανές ότι η μείωση του $Y_{IPS/X} \%$ συνοδεύθηκε από ταυτόχρονη αύξηση του $Y_L/X \%$ ο οποίος έλαβε την μέγιστη τιμή του (39,08 %) στις 90h της βιομετατροπής.

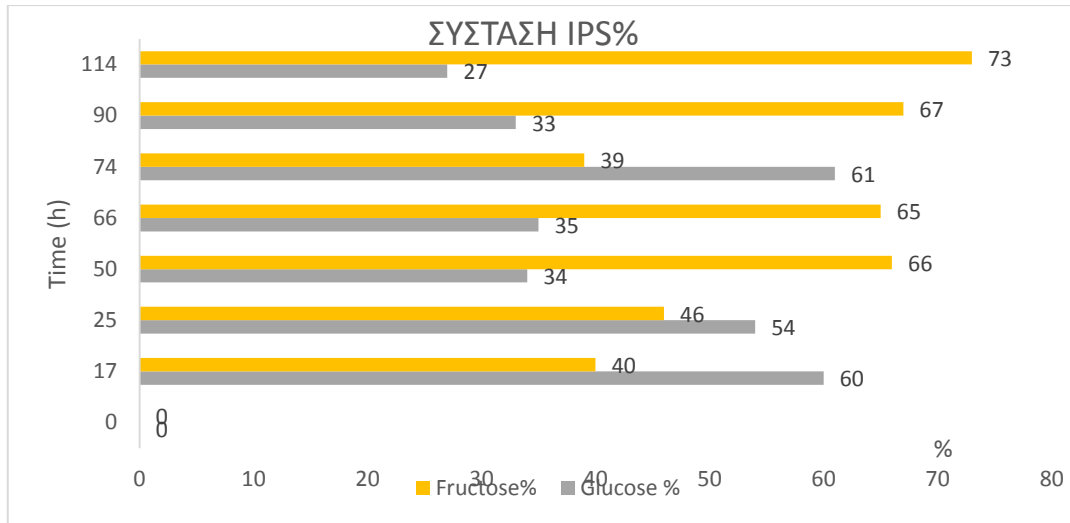


Γράφημα 4.2.2.β Συντελεστής απόδοσης παραγόμενων IPS $Y_{IPS/X} \%$ και ενδοκυτταρικού λίπους ($Y_L/X \%$) ως προς την παραγόμενη βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη (TS0=50 g/L). Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία $T=27 \text{ }^\circ\text{C}$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Σε επόμενο στάδιο έγινε ανάλυση των ενδοπολυσακχαριτών με στόχο την ανίχνευση των δομικών τους μονάδων. Η μελέτη των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ολοκληρώθηκε με τον ποιοτικό προσδιορισμό τους σε κάθε σημείο της κινητικής και παρουσιάζεται στο γράφημα 4.2.2.γ. Στα αρχικά στάδια της βιομετατροπής στη συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών υπερέχει η μορφή γλυκόζης ενώ η συσσώρευση της φρουκτόζης παρατηρείται σε μικρότερο ποσοστό.

Καθίσταται εμφανές όμως, ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρατηρείται μείωση του μονοσακχαρίτη γλυκόζη και ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης του μονοσακχαρίτη φρουκτόζη. Είναι εμφανές το γεγονός της <<κινητικότητας>> των ενδοκυτταρικών μονοσακχαριτών τα οποία συνιστούσαν τις δομές των

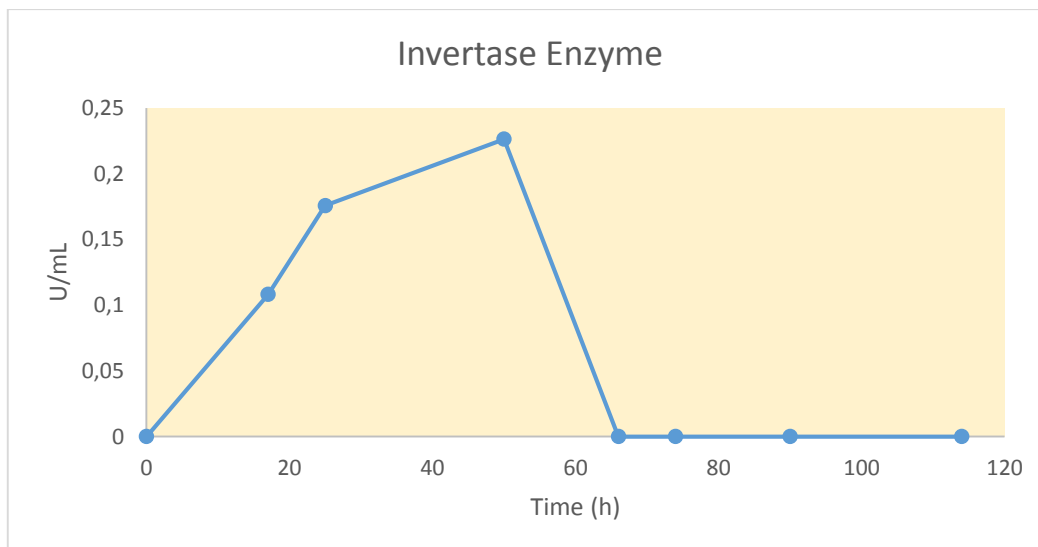
ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής σε συνάρτηση με το χρόνο.



Γράφημα 4.2.2.γ Ποιοτικός προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS) σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης (TS0 =50 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες

4.2.3. Προσδιορισμός ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμβερτάσης.

Τέλος κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα την σακχαρόζη (S0=50 g/L) πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης ο οποίος απεικονίζεται στο γράφημα 4.2.3. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα 0,23 U/mL περί τις 50 h.

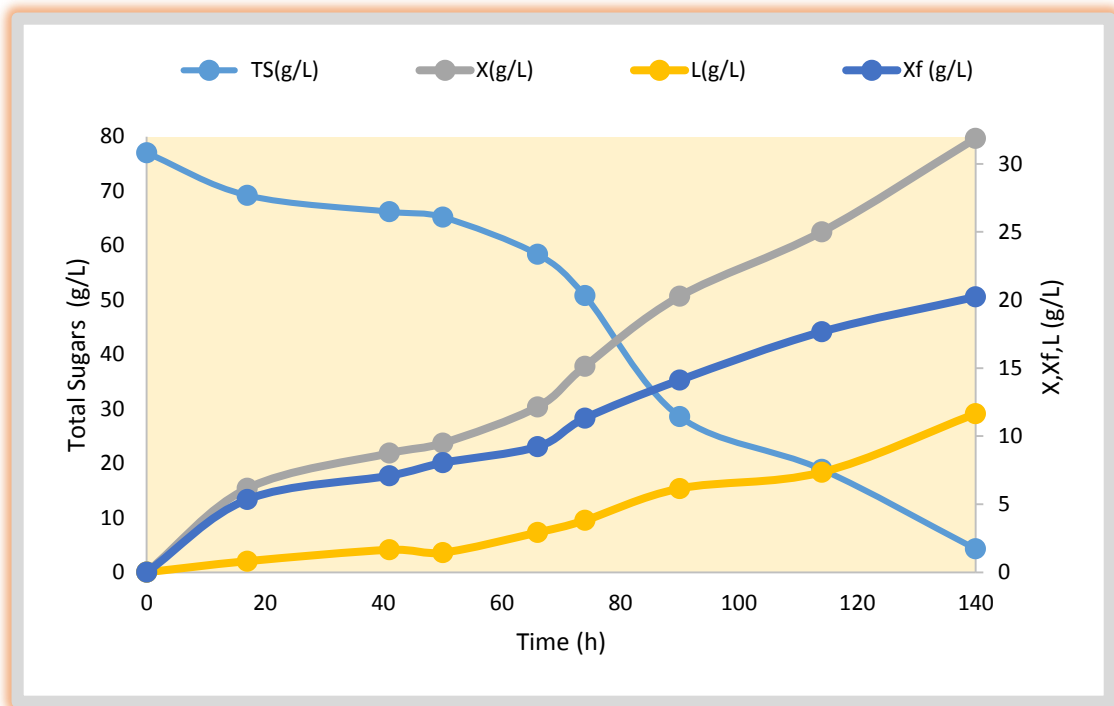


Γράφημα 4.2.3. Προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium Elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης (S0 =50 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

4.3. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας (TS₀=80 g/L)

4.3.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=80 g/L) απεικονίζεται στο γράφημα 4.3.1.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει σημαντική κυτταρική αύξηση με μέγιστη παραγωγή βιομάζας 31,86 g/L περί τις 140 h.



Γράφημα 4.3.1α Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της κατανάλωσης σακχάρων και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, και της ελεύθερης βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα.

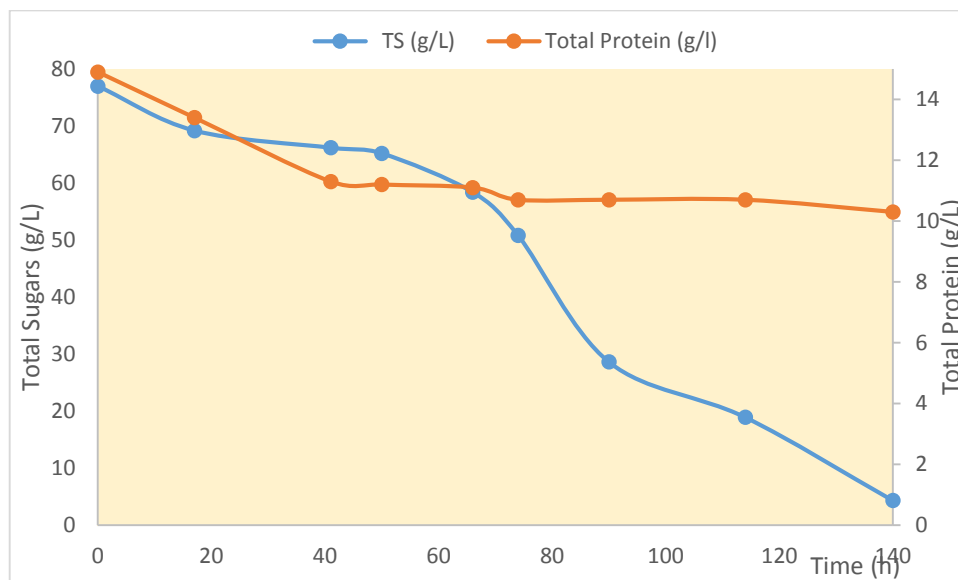
Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS₀ =80 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =14,9 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και πραγματοποιείται εξάντληση της πηγής άνθρακα από τις 140 h. Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους από τον εν λόγω μύκητα στο παρόν υπόστρωμα χαρακτηρίζεται ικανοποιητική και έχει μέγιστη τιμή 11,64 g/L, με συντελεστή απόδοσης (Y_{L/X}) 37% (0.37 g λίπους ανά g παραγόμενης βιομάζας). Ο λόγος C/N δεν χαρακτηρίζεται υψηλός (C/N=49 mol/mol) λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του υποστρώματος σε πρωτεΐνη (S_{pr0}=14,9 g/L).

Παράλληλα με την κατανάλωση των σακχάρων εκ του υποστρώματος παρατηρείται και ταυτόχρονη κατανάλωση της πρωτεΐνης που περιέχει η μελάσα (Γράφημα 4.3.1.β). Κατά την αρχή της βιομετατροπής παρατηρείται μεγαλύτερη κατανάλωση της πρωτεΐνης εκ του υποστρώματος από τον μικροοργανισμό ενώ η κατανάλωση των σακχάρων καθίσταται περιορισμένη. Γίνεται όμως απόλυτα σαφές ότι στις περί των 74 h της βιομετατροπής όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος σε πρωτεΐνη έχει

κατέλθει στα 10,7 g/L η κατανάλωση των ολικών σακχάρων εκ του υποστρώματος αυξάνεται σημαντικά γεγονός που υποδεικνύει ότι όταν οι συνθήκες καλλιέργειας καθίστανται περιοριστικές σε άζωτο αρχίζει η κατανάλωση του άνθρακα εκ του υποστρώματος.

Στις 140 h η συνολική κατανάλωση πρωτεΐνης από τον μικροοργανισμό ανέρχεται στα 4,6 g/L ενώ μετά το πέρας των 140 h η συγκέντρωση των σακχάρων του υποστρώματος έχει κατέλθει στα 4,3 g/L με αποτέλεσμα να αδυνατεί να καλύψει τις βιοσυνθετικές απαιτήσεις σε ενέργεια του μικροοργανισμού.



Γράφημα 4.3.1.β. Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της κατανάλωσης σακχάρων και πρωτεΐνης υποστρώματος, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, και της ελεύθερης λίπους βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία $T=27\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση μελάσας ($TS_0=80\text{ g/L}$) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =14,9 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες

Δεδομένου του γεγονότος μια τυπική πρωτεΐνη, όπως και η σακχαρόζη που αποτελεί το κύριο συστατικό της μελάσας, περιέχει 40 % w/w άνθρακα (Αγγελής, 2007), σε ό,τι αφορά το ποσοστό του άνθρακα μπορεί να θεωρηθεί κατά προσέγγιση ότι 1 g αναλωθείσης πρωτεΐνης αντιστοιχεί με 1 g αναλωθείσης σακχαρόζης.

Έτσι, κατά την πραγματοποιηθείσα βιομετατροπή ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας - υποστρώματος ήταν της τάξης των 0.41 g παραγόμενης ξηράς βιομάζας ανά 1 g καταναλισκόμενου ισοδυνάμου σακχάρου ($Y_{x/s}=41\%$).

Επίσης, στο γράφημα 4.3.1.α. απεικονίζεται η παράμετρος X_f (g/L), η οποία αντιπροσωπεύει την ελεύθερη λίπους βιομάζα. Ταυτόχρονα με τη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους, ο μύκητας εμφανίζει σημαντική κυτταρική αύξηση με αποτέλεσμα η παράμετρος X_f να αυξάνεται μέχρι τις 140 h περίπου στις οποίες λαμβάνει και την μέγιστη τιμή της ($X_{f\text{ max}}=20,22\text{ g/L}$).

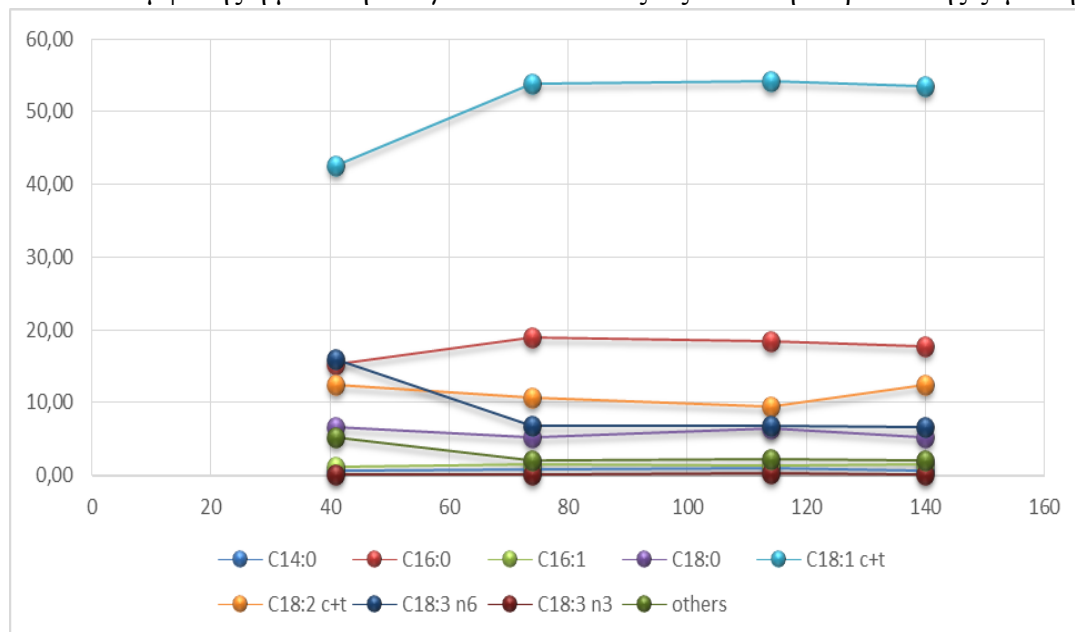
Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε σε επιλεγμένα σημεία της συγκεκριμένης βιομετατροπής. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 4.3.1.

Πίνακας 4.3.1. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας (80 g/L). Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS0 =77 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =14,9 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

time (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 c+t	C18:2 c+t	C18:3 n6	C18:3 n3	others	UI
41	0,72	15,24	1,11	6,63	42,64	12,45	15,96	0,10	5,15	1,17
74	0,83	18,95	1,52	5,27	53,77	10,66	6,88	0,02	2,09	0,97
114	0,91	18,50	1,33	6,45	54,23	9,46	6,72	0,20	2,20	0,95
140	0,70	17,81	1,46	5,22	53,53	12,43	6,58	0,12	2,13	1,00

Τα ολικά λιπίδια του υπό μελέτη μύκητα περιείχαν λιπαρά οξέα με 10 έως 24 άτομα άνθρακα τα κυριότερα από τα οποία ήταν τα κορεσμένα το μυριστικό (C14:0), παλμιτικό (C16:0) και στεατικό (C18:0), το μονοακόρεστο ελαϊκό (C18:1) που ήταν και το μείζον συστατικό και τα πολυακόρεστα λινελαϊκό (C18:2) και γ-λινολενικό (GLA). Σε χαμηλότερα ποσοστά βρέθηκαν βρέθηκαν οξέα όπως, παλμιτελαϊκό, αραχιδικό και σε ορισμένες περιπτώσεις βαξενικό και εικοσιδυοενοϊκό. Από τον πίνακα 4.3.1. βλέπουμε με την εξέλιξη της ζύμωσης το ποσοστό του γ-λινολενικού μειώνεται με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού του μονοακόρεστου ελαϊκού (C18:1) οξέος. Το ποσοστό του γ-λινολενικού παρουσιάζει την μέγιστη συγκέντρωση (15,96%) στις 41 h. Τέλος υπολογίστηκε δείκτης ακορεστότητας (UI %). Όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο περισσότερο ακόρεστα είναι τα λιπίδια και τόσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης ακορεστότητας. Στον πίνακα 4.3.1 φαίνεται ότι κατά την εξέλιξη της βιομετατροπής μειώνεται η ακορεστότητα των λιπιδίων εξαιτίας της μείωσης του ελαϊκού (C18:1) και του γ-λινολενικού οξέος (C18:3) αλλά όχι σε σημαντικό βαθμό λόγω ταυτόχρονης αύξησης του λινελαϊκού οξέος(C18:2).

Η απεικόνιση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%) του μύκητα *T. elegans* στο υπόστρωμα της μελάσας φαίνεται στο γράφημα 4.3.1.γ. Στο γράφημα αυτό είναι εμφανής η μείωση του γ-λινολενικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.



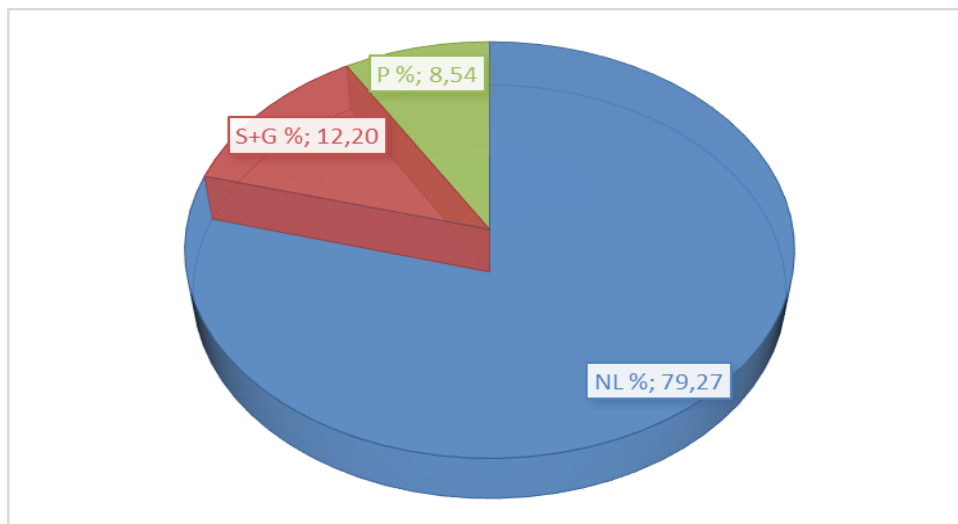
Γράφημα 4.3.1.γ Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%): Μυριστικό οξύ (C14:0), Παλμιτικό οξύ (C16:0), Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), Στεατικό οξύ (C18:0), Ελαϊκό οξύ (C18:1), Λινελαϊκό οξύ (C18:2) α-

λινολενικό (C18:3n3) και γ-λινολενικό οξύ (C18:3n6) και λοιπών οξέων, του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS₀ =77g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =14,9 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Εκτός από την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%), πραγματοποιήθηκε στο στάδιο αυτό η ανάλυση του μικροβιακού λίπους στα επιμέρους κλάσματα των ουδέτερων λιπιδίων, των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων.

Το γράφημα 4.3.1.δ. παρουσιάζει τα ποσοστά των κλασμάτων επί των ολικών λιπιδίων στις 140 h της βιομετατροπής. Από το γράφημα αυτό είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό επί του συνόλου των λιπιδίων (TFA), ενώ τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (S+G) και ιδιαίτερα τα φωσφολιπίδια (P) απαντώνται σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό (P=8,54%).

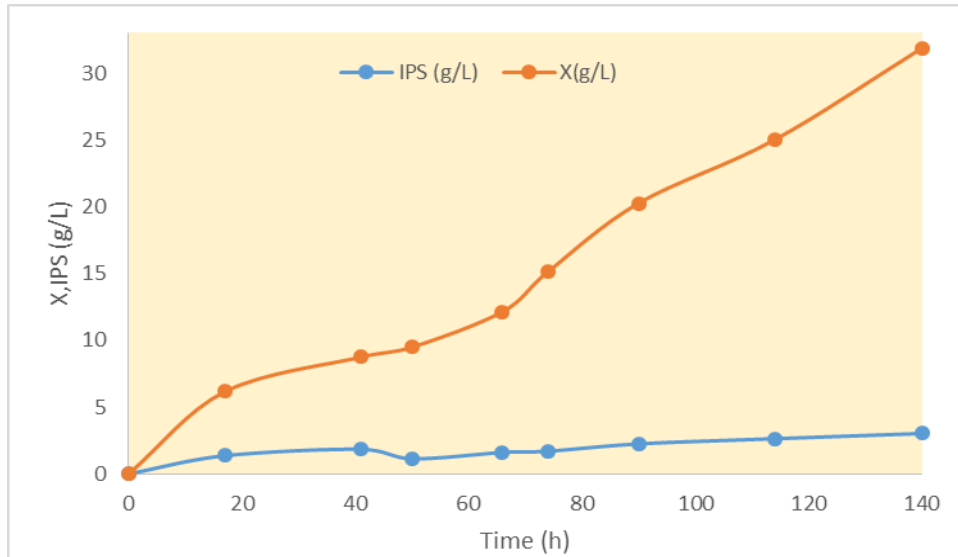
Επομένως η περιεκτικότητα του μυκηλίου σε λιπίδια έδειξε ότι τα ουδέτερα λιπίδια ήταν το κυρίαρχο λιπιδιακό κλάσμα σε σχέση με τα πολικά λιπίδια (γλυκολιπίδια, σφιγγολιπίδια και φωσφολιπίδια).



Γράφημα 4.3.1.δ. Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TFA) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα στην χρονική περίοδο των 140 h της βιομετατροπής. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS₀ =77 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =14.6 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

4.3.2. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου και ανά μονάδα βιομάζας.

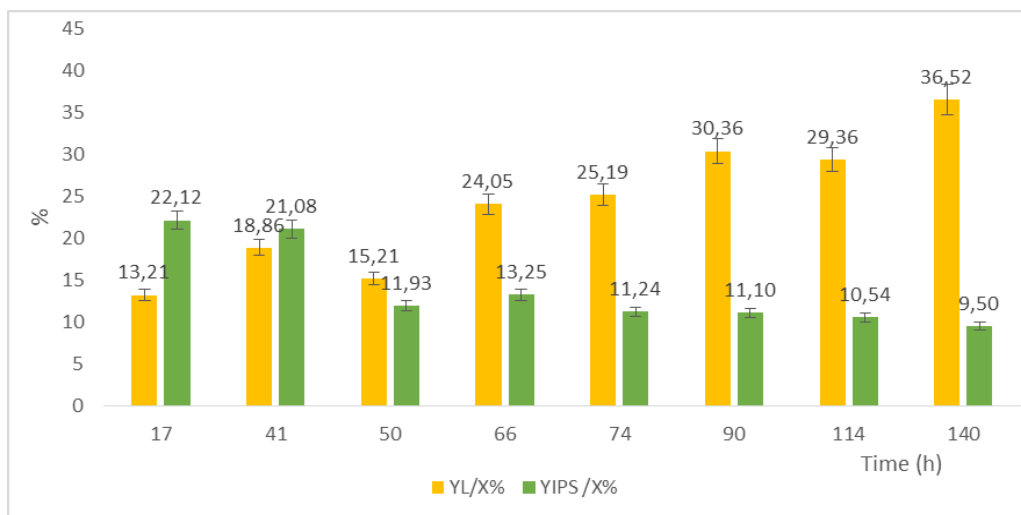
Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Η κινητική μελέτης της συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών και της παραγόμενης βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=80 g/L) απεικονίζεται στο γράφημα 4.3.2.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών με μέγιστη συγκέντρωση 3,03 g/L περί τις 140 h.



Γράφημα 4.3.2.a Κινητική μελέτη της συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών και της παραγόμενης βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grm) και θερμοκρασία $T=27\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση μελάσας ($TS_0 = 77\text{ g/L}$) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein = $14,9\text{ g/L}$), υπό αερόβιες συνθήκες.

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα της άνω κινητικής η παραγωγή IPS σε g/L αυξανόταν συνεχώς μέχρι τις 140 h της βιομετατροπής όπου λαμβάνει και την μέγιστη τιμή της περί των 3,03 g/L (Γράφημα 4.3.2.a).

Επίσης η ποσότητα των ενδοπολυσακχαριτών ανα μονάδα βιομάζας ($Y_{IPS}/X\%$, w/w) αρχικά αυξανόταν με το χρόνο καλλιέργειας *Thamnidium elegans* λαμβάνοντας μέγιστη τιμή του $Y_{IPS}/X_{max}=22,12\%$ περί των 17h στη συνέχεια όμως υπήρξε μείωση-ανακατανάλωση των ήδη συσσωρευμένων ενδοπολυσακχαριτών. Συγκρίνοντας τον συντελεστή απόδοσης παραγόμενων IPS ($Y_{IPS}/X\%$) και τον αντίστοιχο του ενδοκυτταρικού λίπους ($Y_L/X\%$) ως προς την παραγόμενη βιομάζα (Γράφημα 4.3.2.β) είναι εμφανές ότι η μείωση του $Y_{IPS}/X\%$ συνοδεύθηκε από ταυτόχρονη αύξηση του $Y_L/X\%$ ο οποίος έλαβε την μέγιστη τιμή ($Y_L/X_{max}= 37\%$)του στις 140 h της βιομετατροπής.

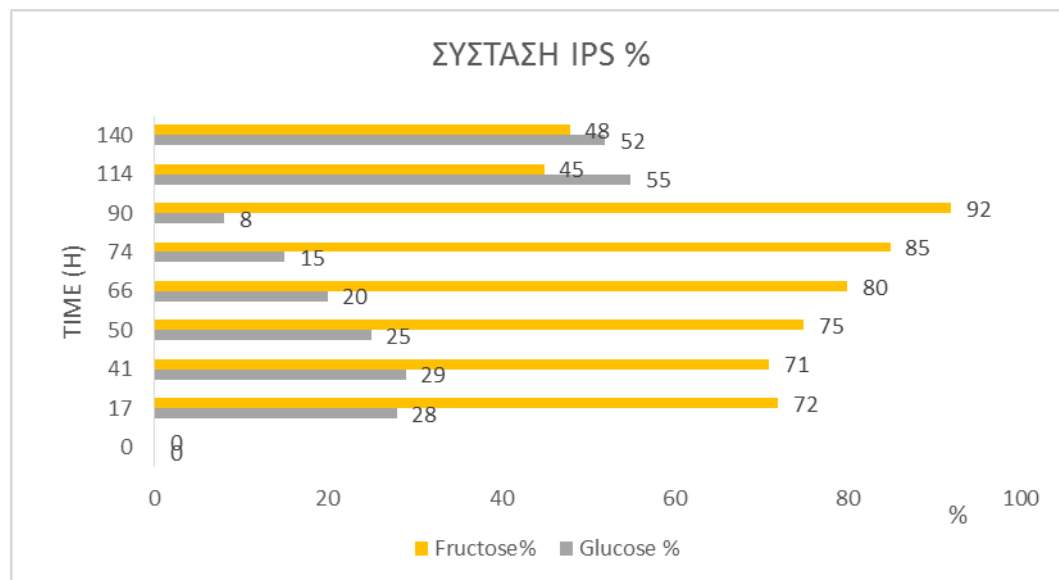


Γράφημα 4.3.2.β Συντελεστής απόδοσης ενδοπολυσακχαριτών $Y_{IPS}/X\%$ και ενδοκυτταρικού λίπους ($Y_L/X\%$) ως προς την παραγόμενη βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα

Thamnidium elegans κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=80 g/L). Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (S₀ =77 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =14,9 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

Σε επόμενο στάδιο έγινε ανάλυση των ενδοπολυσακχαριτών με στόχο την ανίχνευση των δομικών τους μονάδων. Η μελέτη των ενδοπολυσακχαριτών ολοκληρώθηκε με τον ποιοτικό προσδιορισμό τους σε κάθε σημείο της κινητικής και παρουσιάζεται στο γράφημα 4.3.2.γ. Στα αρχικά στάδια της βιομετατροπής στη συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών υπερέχει η μορφή φρουκτόζης ενώ η συσσώρευση της γλυκόζης παρατηρείται σε μικρότερο ποσοστό.

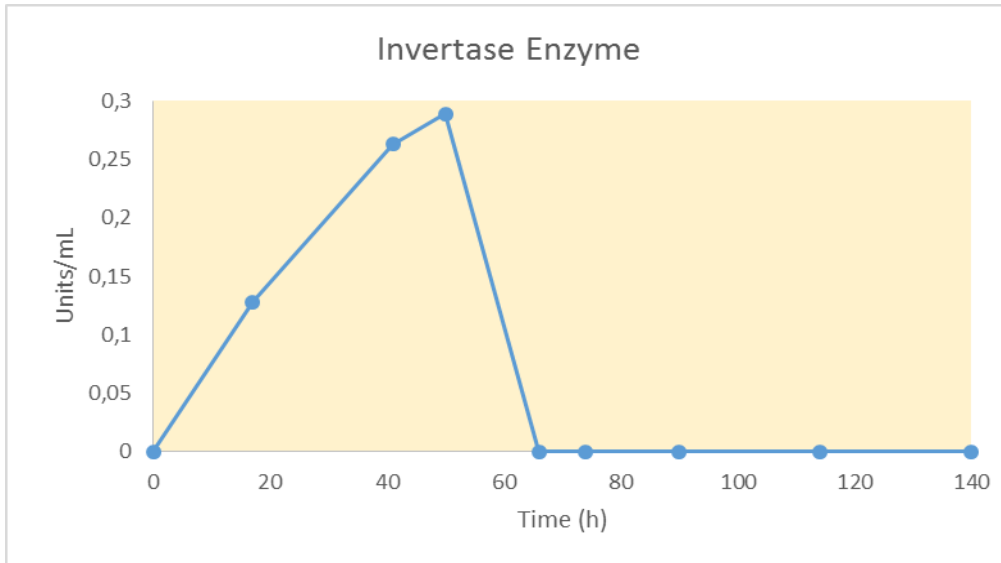
Καθίσταται εμφανές όμως, ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρατηρείται μείωση του μονοσακχαρίτη φρουκτόζη και ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης του μονοσακχαρίτη γλυκόζη. Είναι εμφανές το γεγονός της <<κινητικότητας>> των ενδοκυτταρικών μονοσακχαριτών τα οποία συνιστούσαν τις δομές των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής σε συνάρτηση με το χρόνο.



Γράφημα 4.3.2.γ Ποιοτικός προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS) σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα .Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS₀ =77 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =14,9 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

4.3.3. Προσδιορισμός ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμβερτάσης.

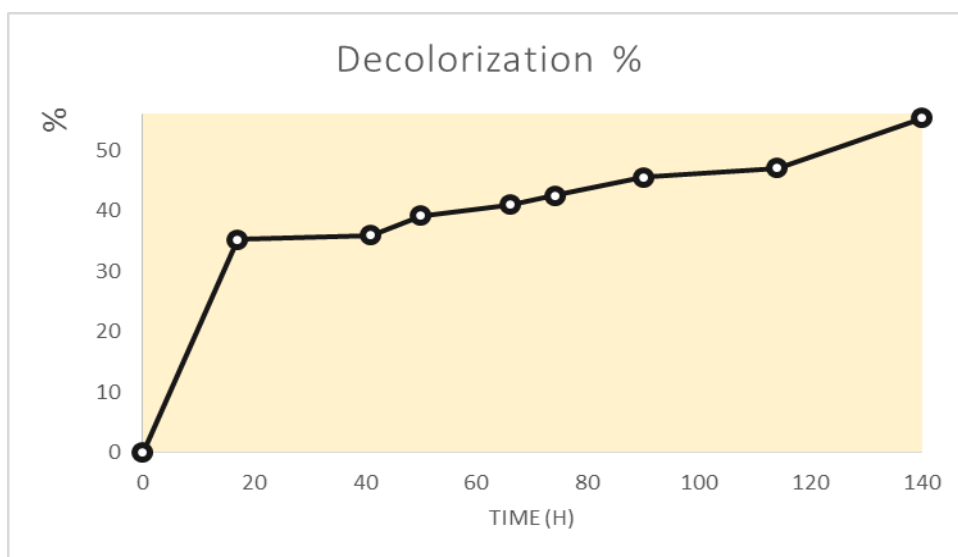
Κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=80 g/L) πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης ο οποίος απεικονίζεται στο γράφημα 4.3.3. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα 0,29 U/mL περί τις 50 h.



Γράφημα 4.3.3. Προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ινβερτάσης κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS₀ =77 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =14,9 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

4.3.4. Προσδιορισμός βαθμού αποχρωματισμού υποστρώματος.

Τέλος πραγματοποιήθηκε μέλετη της εξέλιξης του αποχρωματισμού του θρεπτικού μέσου. Κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής παρατηρήθηκε αποχρωματισμός του μέσου με μέγιστο ποσοστό 55,3 % περί των 140 h. Το γεγονός αυτό δείχνει την ικανότητα στου στελέχους *Thamnidium elegans* να διασπάει τις μελανοιδίνες καθώς και υπόλοιπες χρωστικές ουσίες του υποστρώματος. Η εξέλιξη του αποχρωματισμού του μέσου καλλιέργειας (Γράφημα 4.3.4) με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (S₀=80 g/L) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρουσιάζεται αναλυτικά στο επόμενο γράφημα.

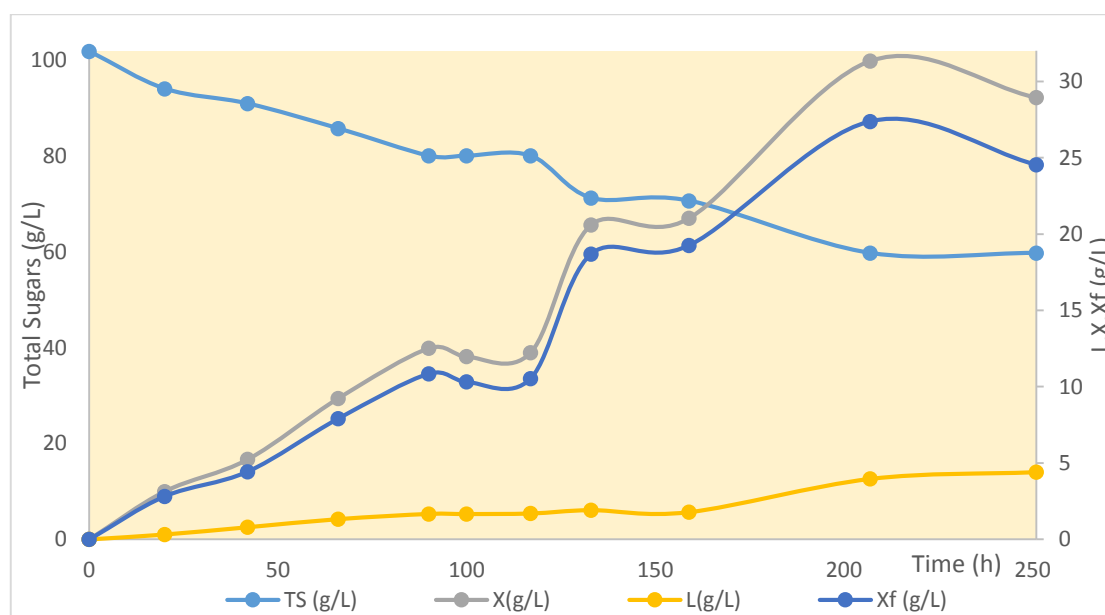


Γράφημα 4.3.4 Η εξέλιξη του αποχρωματισμού του μέσου καλλιέργειας του μύκητα *Thamnidium Elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS₀ =77 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =14,9 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

4.4. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας (TS₀=100 g/L)

4.4.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=100 g/L) απεικονίζεται στο γράφημα 4.4.1.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει σημαντική κυτταρική αύξηση με μέγιστη παραγωγή βιομάζας 31,34 g/L περί τις 207 h.



Γράφημα 4.4.1α Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της κατανάλωσης σακχάρων και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, και της ελεύθερης βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS₀ =101,9 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =25,5 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

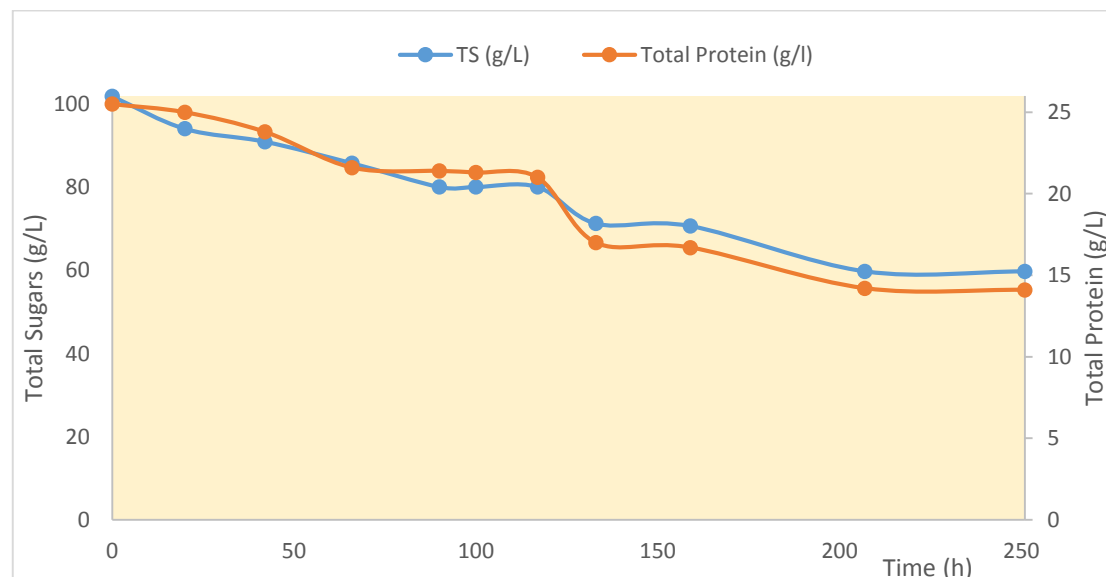
Θα πρέπει να τονιστεί επίσης ότι παρά το γεγονός ότι παράχθηκαν υψηλά ποσά βιομάζας, σχετικά μικρός είναι και ο ρυθμός κατανάλωσης των σακχάρων εκ του υποστρώματος, με προφανή αποτελέσματα αφ' ενός μεν αδυναμία βιομετατροπής των σακχάρων σε λίπος και αφ' ετέρου τη μειωμένη δυναμική απορρόπησης του αποβλήτου ειδικά στις τελευταίες φάσεις του μικροβιακού αυξητικού κύκλου. Στις 251 h ο μικροοργανισμός παρουσίασε τιμή βιομάζας 28,94 g/L ενώ ιδιαίτερα αυξημένη ήταν η παρουσία των σακχάρων στο περιβάλλον της ανάπτυξης (τελική συγκέντρωση σακχάρων 59,8 g/L – ανάλωση περί το 40% w/w των διαθέσιμων σακχάρων παρά τον αυξημένο χρόνο ζύμωσης).

Η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και δεν πραγματοποιείται εξάντληση της πηγής άνθρακα ούτε της πηγής αζώτου του υποστρώματος μέχρι τις 251 h. Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους από τον εν λόγω μύκητα στο παρόν υπόστρωμα δεν χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα υψηλή και έχει μέγιστη τιμή 4,41 g/L, με συντελεστή απόδοσης (Y_{L/X}) 15% (0.15 g λίπους ανά g παραγόμενης βιομάζας) % ενώ οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί συσσωρεύουν λίπος

με YL/X μεγαλύτερο του 20% (Ratledge, 1994; Ratledge *et al.*, 2005; Αγγελής, 2007). Το γεγονός αυτό οφείλεται εν μέρη στο χαμηλό λόγο C/N=13 mol/mol λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του υποστρώματος σε πρωτεΐνη 25,5 g/L. Σύμφωνα με μελέτες, δείχθηκε ότι πέρα από τον υψηλό λόγο C/N, πολύ σημαντικός παράγοντας ο οποίος εμπλέκεται στη βιομετατροπή του σακχάρου σε λίπος κατά τη *de novo* διεργασία παραγωγής λίπους από σάκχαρα, είναι και ο ρυθμός κατανάλωσης του σακχάρου από το μέσο της ανάπτυξης (Papanikolaou *et al.*, 2007; Fakas *et al.*, 2008). Στην παρούσα κινητική η βραδεία κατανάλωση των σακχάρων εκ του υποστρώματος καθιστούν το μικροοργανισμό ακατάλληλο για βιομετατροπή της μελάσας σε μικροβιακό λίπος, καθόσον πέρα από τον λόγο C/N στο μέσο της καλλιέργειας, άκρως σημαντικός είναι και ο παράγοντας της ταχείας αφομοίωσης του σακχάρου εντός των μυκηλιακών δομών, προκειμένου να υπάρξει ένας σχετικά υψηλός ενδοκυτταρικός λόγος C/N που θα έχει ως απόρροια σύνθεση μικροβιακού λίπους (Papanikolaou *et al.*, 2007; Fakas *et al.*, 2008).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ πολλοί ελαιογόνοι μικροοργανισμοί εμφανίζουν πλήρη ανάλωση του σακχάρου και συνεχή βιομετατροπή του σε λίπος υπό συνθήκες περιοριστικές σε άζωτο (Ratledge, 1994), υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες η καλλιέργεια μικροοργανισμών δεν συνοδεύεται από εξάντληση του σακχάρου στο μέσο της καλλιέργειας (Gema *et al.*, 2002; Fakas *et al.*, 2008) ενώ ενίοτε παρατηρείται η τάση να είναι πλήρης η παύση της ανάλωσης του σακχάρου από το περιβάλλον της ανάπτυξης λόγω περιορισμένης δραστηριότητας του μηλικού ενζύμου, το οποίο στις περιπτώσεις αυτές δρα ως η κύρια πηγή παραγωγής NADPH₂ που συμμετέχει στην παραγωγή λίπους (Ratledge, 2002).

Παράλληλα με την κατανάλωση των σακχάρων εκ του υποστρώματος παρατηρείται και ταυτόχρονη κατανάλωση της πρωτεΐνης που περιέχει η μελάσα. Στις 251 h η συνολική κατανάλωση πρωτεΐνης από τον μικροοργανισμό ανέρχεται στα 11,4 g/L ενώ μετά το πέρας των 251 h η συγκέντρωση των σακχάρων του υποστρώματος έχει κατέλθει στα 59,8 g/L.



Γράφημα 4.4.1.β. Κινητική της εξέλιξης κατανάλωσης σακχάρων και πρωτεΐνης υποστρώματος, συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS0 =101,9 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =25,5 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Δεδομένου του γεγονότος μια τυπική πρωτεΐνη, όπως και η σακχαρόζη που αποτελεί το κύριο συστατικό της μελάσας, περιέχει 40 % w/w άνθρακα (Αγγελής 2007), σε ό,τι αφορά το ποσοστό του άνθρακα μπορεί να θεωρηθεί κατά προσέγγιση ότι 1 g αναλωθείσης πρωτεΐνης αντιστοιχεί με 1 g αναλωθείσης σακχαρόζης. Έτσι, κατά την πραγματοποιηθείσα βιομετατροπή ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας - υποστρώματος ήταν της τάξης των 0.58 g παραγόμενης ξηράς βιομάζας ανά 1 g καταναλισκόμενου ισοδυνάμου σακχάρου ($Y_{x/s}=58\%$).

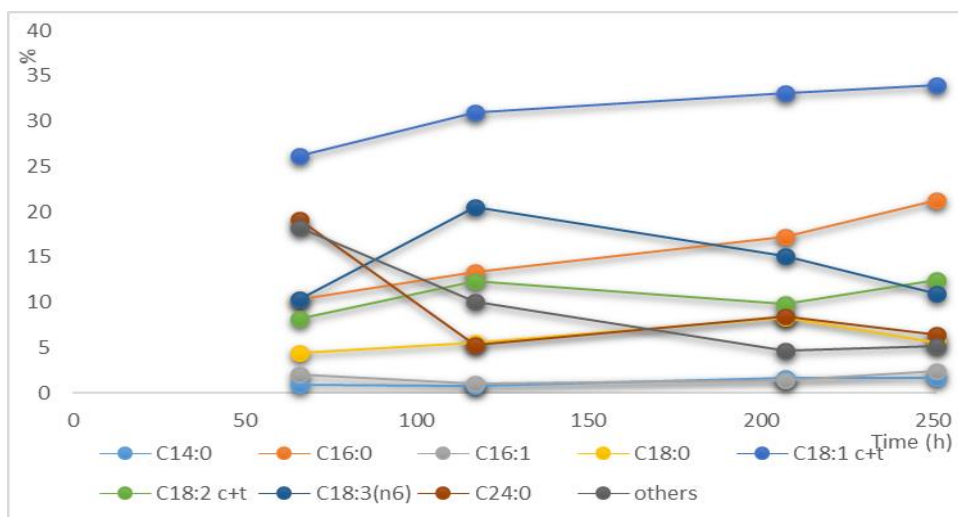
Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε σε επιλεγμένα σημεία της συγκεκριμένης βιομετατροπής. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4.4.1.)

Πίνακας 4.4.1. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grml) και θερμοκρασία $T=27\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας ($TS_0=101,9\text{ g/L}$) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =25,5 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Time (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 c+t	C18:2 c+t	C18:3(n6)	C24:0	others	UI
66	0,85	10,29	2	4,46	26,24	8,15	10,28	19,15	18,25	0,76
117	0,81	13,35	1,06	5,49	30,92	12,31	20,51	5,31	10,1	1,19
207	1,59	17,19	1,41	8,3	33,14	9,86	15,1	8,49	4,7	1
251	1,64	21,33	2,39	5,54	34,03	12,45	10,94	6,46	5,12	0,94

Τα ολικά λιπίδια του υπό μελέτη μύκητα περιείχαν λιπαρά οξέα με 10 έως 24 άτομα άνθρακα τα κυριότερα από τα οποία ήταν τα κορεσμένα το μυριστικό (C14:0), παλμιτικό (C16:0) και στεατικό (C18:0), το τετρακοζανοϊκό (C:24) το μονοακόρεστο ελαϊκό (C18:1) που ήταν και το μείζον συστατικό και τα πολυακόρεστα λινελαϊκό (C18:2) και γ-λινολενικό (GLA). Σε χαμηλότερα ποσοστά βρέθηκαν βρέθηκα οξέα όπως, παλμιτελαϊκό, αραχιδικό και σε ορισμένες περιπτώσεις βαξενικό και εικοσιδυοενοϊκό. Από τον πίνακα 4.4.1. βλέπουμε με την εξέλιξη της ζύμωσης το ποσοστό του γ-λινολενικού μειώνεται με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού του μυριστικού (C14:0), παλμιτικού (C16:0) και του λινελαϊκού (C18:2) οξέος. Το ποσοστό του γ-λινολενικού παρουσιάζει την μέγιστη συγκέντρωση (20,51%) στις 117 h. Την ίδια περίπου εξέλιξη με το γ-λινολενικό οξύ παρουσιάζει το στεατικό (C18:0) οξύ. Τέλος υπολογίστηκε δείκτης ακορεστότητας (UI%). Στον πίνακα 4.4.1 φαίνεται ότι κατά την εξέλιξη της βιομετατροπής δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στο ποσοστό του δείκτη ακορεστότητας λόγω περιορισμένης αύξησης του ελαϊκού (C18:1), του λινελαϊκού (C18:2) και του γ-λινολενικού οξέος (C18:3).

Η απεικόνιση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%) του μύκητα *T. elegans* στο υπόστρωμα της μελάσας φαίνεται στο γράφημα 4.4.1.γ. Στο γράφημα αυτό είναι εμφανής η αυξομείωση του γ-λινολενικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

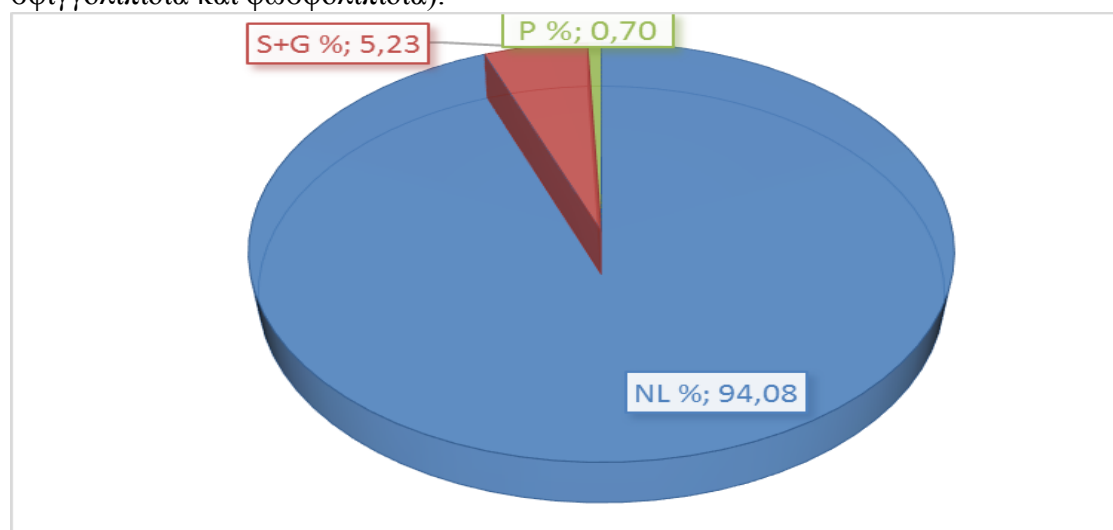


Γράφημα 4.4.1.γ. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%): Μυριστικό οξύ (C14:0), Παλμιτικό οξύ (C16:0), Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), Στεατικό οξύ (C18:0), Ελαϊκό οξύ (C18:1), Λινελαϊκό οξύ (C18:2) α-λινολενικό (C18:3n3) και γ-λινολενικό οξύ (C18:3n6) και λοιπών οξέων, του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS0 =101,9 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =25,5 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Εκτός από την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%), πραγματοποιήθηκε στο στάδιο αυτό η ανάλυση του μικροβιακού λίπους στα επιμέρους κλάσματα των ουδέτερων λιπιδίων, των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων.

Το γράφημα 4.4.1.δ. παρουσιάζει τα ποσοστά των κλασμάτων επί των ολικών λιπιδίων στις 251 h της βιομετατροπής. Από το γράφημα αυτό είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό επί του συνόλου των λιπιδίων (TFA), ενώ τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (SG) και ιδιαίτερα τα φωσφολιπίδια (P) απαντώνται σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό (P=0,7%).

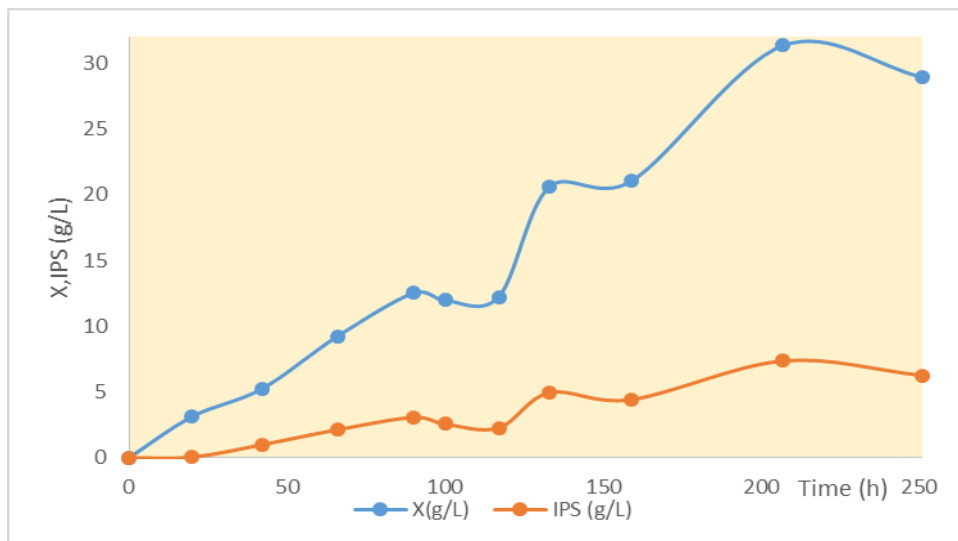
Επομένως η περιεκτικότητα του μυκηλίου σε λιπίδια έδειξε ότι τα ουδέτερα λιπίδια ήταν το κυρίαρχο λιπιδιακό κλάσμα σε σχέση με τα πολικά λιπίδια (γλυκολιπίδια, σφιγγολιπίδια και φωσφολιπίδια).



Γράφημα 4.4.1.δ. Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TFA) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα στην χρονική περίοδο των 251 h της βιομετατροπής. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (S0 =101,9 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =25,5 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες

4.4.2. Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου και ανά μονάδα βιομάζας.

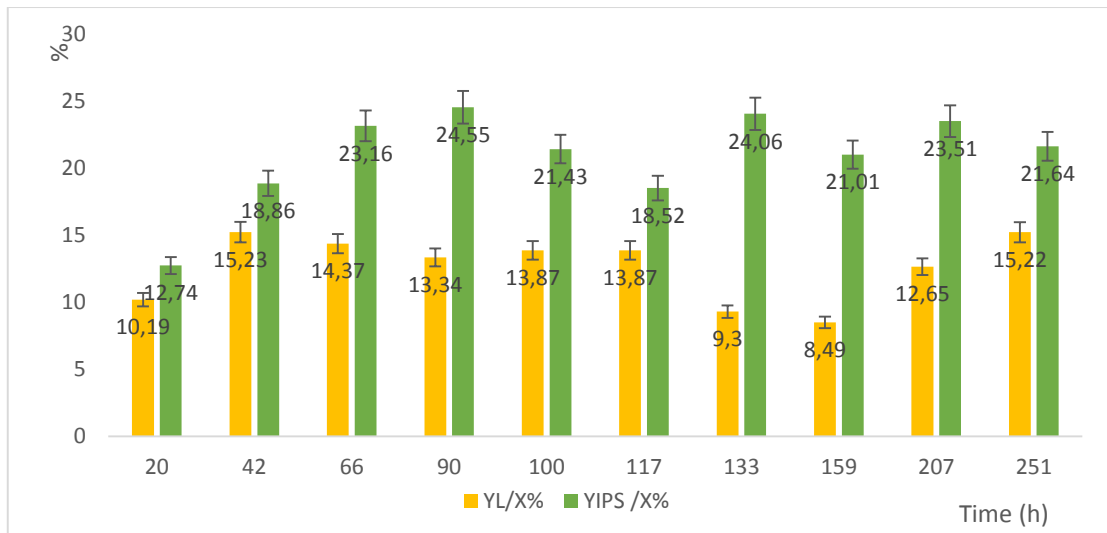
Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Η κινητική μελέτης στις συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών και της παραγόμενης βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=100 g/L) απεικονίζεται στο γράφημα 4.4.2.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει σημαντική συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών με μέγιστη συγκέντρωση 7,37 g/L περί τις 207 h.



Γράφημα 4.4.2.α Κινητική μελέτης στις συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών και της παραγόμενης βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (100 g/L). Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS₀ =101,9 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =25,5 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα της άνω κινητικής η συσσώρευση IPS σε g/L αυξανόταν συνεχώς μέχρι τις 207 h της βιομετατροπής έπειτα όμως από το πέρας του εν λόγω χρονικού διαστήματος παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσής τους, προς το τέλος της βιομετατροπής.

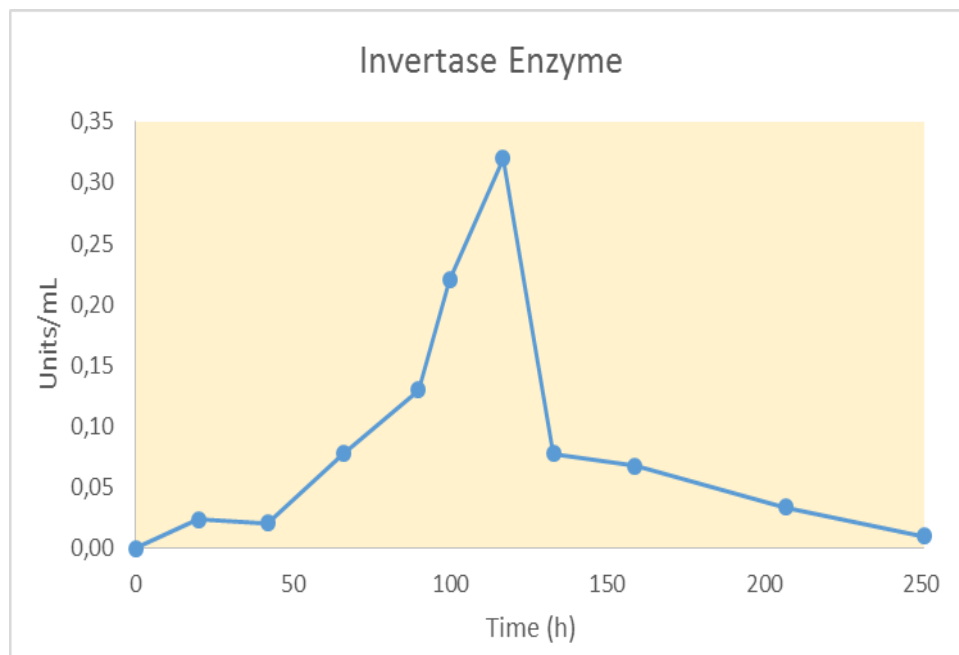
Επίσης η ποσότητα των ενδοπολυσακχαριτών ανα μονάδα βιομάζας ($Y_{IPS}/X\%$, w/w) αρχικά αυξανόταν με το χρόνο καλλιέργειας *Thamnidium elegans* (Γράφημα 4.4.2.β) στη συνέχεια όμως υπήρξε μικρή αυξομείωση του ποσοστού τους. Συγκρίνοντας τον συντελεστή απόδοσης ενδοπολυσακχαριτών IPS, ($Y_{IPS}/X\%$) και τον αντίστοιχο του ενδοκυτταρικού λίπους ($Y_L/X\%$) ως προς την παραγόμενη βιομάζα είναι εμφανές ότι ο $Y_{IPS}/X\%$ φέρει την μέγιστη τιμή του στις 90 h και ακολουθεί ανάλογη αυξομείωση με τον $Y_L/X\%$ ο οποίος έλαβε την μέγιστη τιμή του στις 42 h της βιομετατροπής.



Γράφημα 4.4.2.β Συντελεστής απόδοσης ενδοπολυσακχαριτών IPS, YIPS /X%, και ενδοκυτταρικού λίπους (YL /X%) ως προς την παραγόμενη βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS₀ =101,9 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =25,5 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες

4.4.3. Προσδιορισμός ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμβεργτάσης.

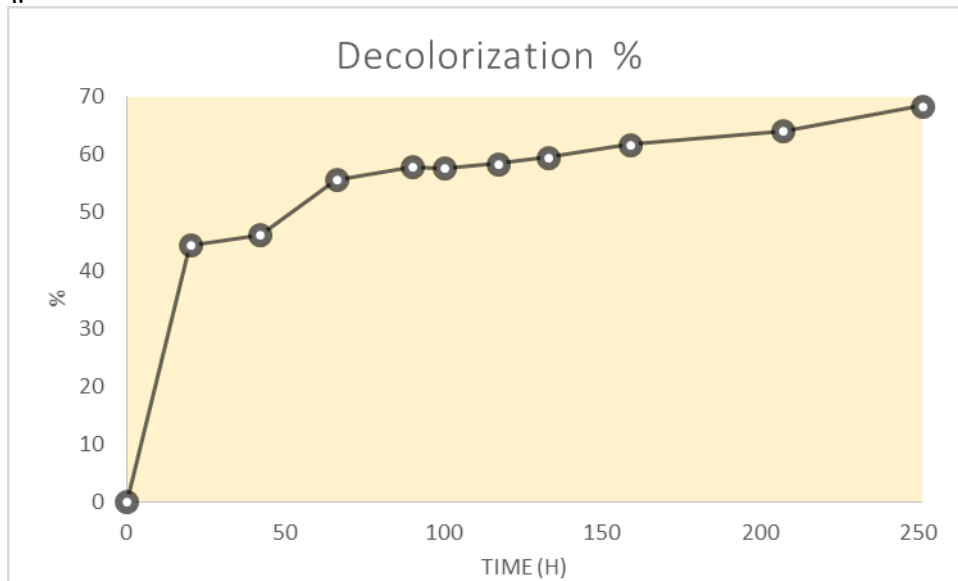
Κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=100 g/L) πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβεργτάσης ο οποίος απεικονίζεται στο γράφημα 4.4.3. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα 0,32 U/mL περί τις 117 h.



Γράφημα 4.4.3. Προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβεργτάσης κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS₀ =101,9 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =25,5 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

4.4.4. Προσδιορισμός βαθμού αποχρωματισμού υποστρώματος.

Τέλος πραγματοποιήθηκε μέλετη της εξέλιξης του αποχρωματισμού του θρεπτικού μέσου (Γράφημα 4.4.4). Κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής παρατηρήθηκε αποχρωματισμός του μέσου με μέγιστο ποσοστό 68,5% περί των 251 h. Το γεγονός αυτό δείχνει την ικανότητα στου στελέχους *Thamnidium elegans* να διασπάει τις μελανοιδίνες καθώς και υπολοιπες χρωστικές ουσίες του υποστρώματος. Η εξέλιξη του αποχρωματισμού του μέσου καλλιέργειας με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=100 g/L) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρουσιάζεται αναλυτικά στο επόμενο γράφημα.

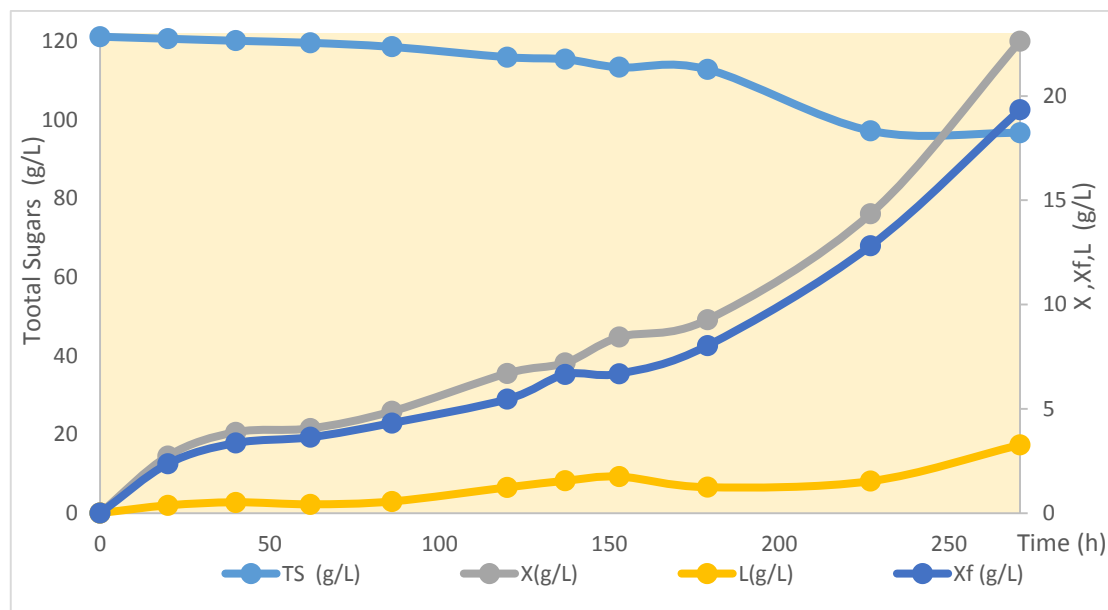


Γράφημα 4.4.4 Η εξέλιξη του αποχρωματισμού του μέσου καλλιέργειας του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS₀ =101,9 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =25,5 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες

4.5. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας (TS₀=120 g/L)

4.5.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=120 g/L) απεικονίζεται στο γράφημα 4.5.1.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι παρά το γεγονός ότι παράχθηκαν υψηλά ποσά βιομάζας, σχετικά μικρός είναι ο ρυθμός κατανάλωσης των σακχάρων εκ του υποστρώματος, με προφανή αποτελέσματα αφ' ενός μεν αδυναμία βιομετατροπής των σακχάρων σε λίπος και αφ' ετέρου τη μειωμένη δυναμική απορρύπανσης του αποβλήτου ειδικά στις τελευταίες φάσεις του μικροβιακού αυξητικού κύκλου. Στις 271 h ο μικροοργανισμός παρουσίασε μέγιστη παραγωγή βιομάζας 22,62 g/L ενώ ιδιαίτερα αυξημένη ήταν η παρουσία των σακχάρων στο περιβάλλον της ανάπτυξης (τελική συγκέντρωση σακχάρων 96,74 g/L – ανάλωση περί το 20% w/w των διαθέσιμων σακχάρων παρά τον αυξημένο χρόνο ζύμωσης).



Γράφημα 4.5.1.α Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της κατανάλωσης σακχάρων, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, και της ελεύθερης βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS₀ =121,2 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =31,8 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

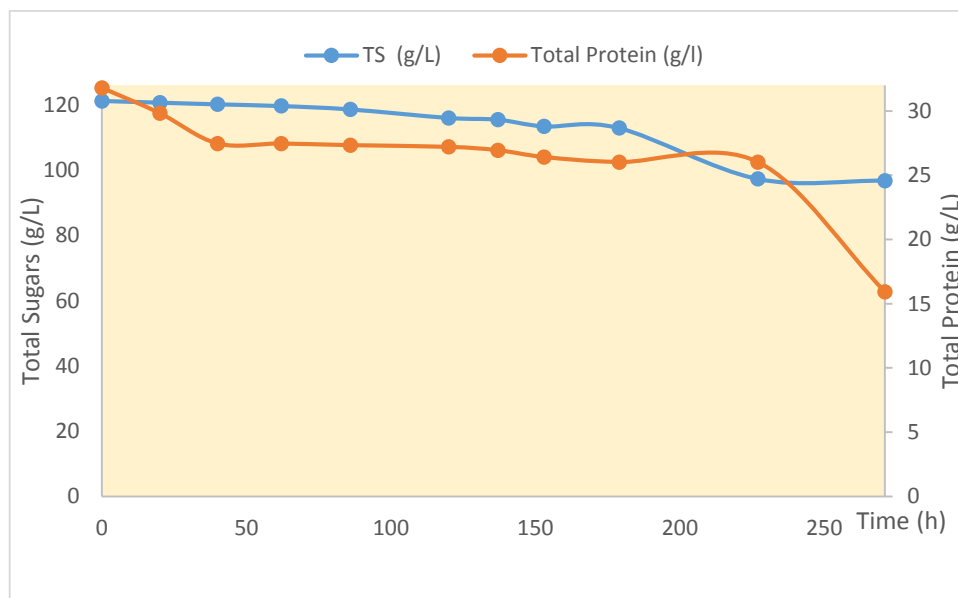
Η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και δεν πραγματοποιείται εξάντληση της πηγής άνθρακα ούτε της πηγής αζώτου του υποστρώματος μέχρι τις 271 h. Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους από τον εν λόγω μύκητα στο παρόν υπόστρωμα δεν χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα υψηλή και έχει μέγιστη τιμή 3,28 g/L, με συντελεστή απόδοσης (Y_{LX}) 14,5% (0.145 g λίπους ανά g παραγόμενης βιομάζας) ενώ οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί συσσωρεύουν λίπος με Y_{LX} μεγαλύτερο του 20% (Ratledge, 1994; Ratledge *et al.*, 2005; Αγγελής, 2007). Το

γεγονός αυτό οφείλεται εν μέρη στο χαμηλό λόγο C/N=14 mol/mol λόγω της υψηλής αρχικής περιεκτικότητας του υποστρώματος σε πρωτεΐνη (31,8 g/L).

Σύμφωνα με μελέτες, δείχθηκε ότι πέρα από τον υψηλό λόγο C/N, πολύ σημαντικός παράγοντας ο οποίος εμπλέκεται στη βιομετατροπή του σακχάρου σε λίπος κατά τη *de novo* διεργασία παραγωγής λίπους από σάκχαρα, είναι και ο ρυθμός κατανάλωσης του σακχάρου από το μέσο της ανάπτυξης (Paranikolaou *et al.*, 2007; Fakas *et al.*, 2008). Στην παρούσα κινητική η βραδεία κατανάλωση των σακχάρων εκ του υποστρώματος καθιστούν το μικροοργανισμό ακατάλληλο για βιομετατροπή της μελάσας σε μικροβιακό λίπος, καθόσον πέρα από τον λόγο C/N στο μέσο της καλλιέργειας, άκρως σημαντικός είναι και ο παράγοντας της ταχείας αφομοίωσης του σακχάρου εντός των μυκηλιακών δομών, προκειμένου να υπάρξει ένας σχετικά υψηλός ενδοκυτταρικός λόγος C/N που θα έχει ως απόρροια σύνθεση μικροβιακού λίπους (Paranikolaou *et al.*, 2007; Fakas *et al.*, 2008).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ πολλοί ελαιογόνοι μικροοργανισμοί εμφανίζουν πλήρη ανάλωση του σακχάρου και συνεχή βιομετατροπή του σε λίπος υπό συνθήκες περιοριστικές σε άζωτο (Ratledge, 1994), υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες η καλλιέργεια μικροοργανισμών δεν συνοδεύεται από εξάντληση του σακχάρου στο μέσο της καλλιέργειας (Gema *et al.*, 2002; Fakas *et al.*, 2008) ενώ ενίοτε παρατηρείται η τάση να είναι πλήρης η παύση της ανάλωσης του σακχάρου από το περιβάλλον της ανάπτυξης λόγω περιορισμένης δραστηριότητας του μηλικού ενζύμου, το οποίο στις περιπτώσεις αυτές δρα ως η κύρια πηγή παραγωγής NADPH₂ που συμμετέχει στην παραγωγή λίπους (Ratledge, 2002).

Παράλληλα με την κατανάλωση των σακχάρων εκ του υποστρώματος παρατηρείται και ταυτόχρονη κατανάλωση της πρωτεΐνης που περιέχει η μελάσα. Στις 271 h η συνολική κατανάλωση πρωτεΐνης από τον μικροοργανισμό ανέρχεται στα 15,9 g/L ενώ μετά το πέρας των 271 h η συγκέντρωση των σακχάρων του υποστρώματος έχει κατέλθει στα 96,7 g/L.



Γράφημα 4.5.1β Κινητική της εξέλιξης της κατανάλωσης σακχάρων και πρωτεΐνης υποστρώματος, συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (S₀ =121,2 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =31,8 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Δεδομένου του γεγονότος μια τυπική πρωτεΐνη, όπως και η σακχαρόζη που αποτελεί το κύριο συστατικό της μελάσας, περιέχει 40 % w/w άνθρακα (Αγγελής, 2007), σε ό,τι αφορά το ποσοστό του άνθρακα μπορεί να θεωρηθεί κατά προσέγγιση ότι 1 g αναλωθείσης πρωτεΐνης αντιστοιχεί με 1 g αναλωθείσης σακχαρόζης. Έτσι, κατά την πραγματοποιηθείσα βιομετατροπή ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας - υποστρώματος ήταν της τάξης των 0.56 g παραγόμενης ξηράς βιομάζας ανά 1 g καταναλισκόμενου ισοδυνάμου σακχάρου ($Y_{x/s}=56\%$).

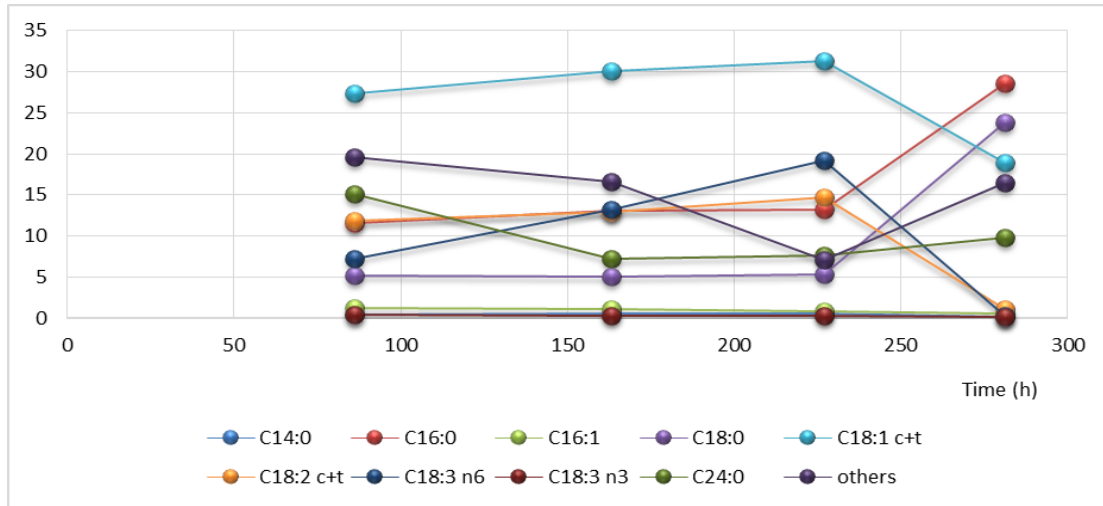
Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε σε επιλεγμένα σημεία της συγκεκριμένης βιομετατροπής. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4.5.1.)

Πίνακας 4.5.1. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (S0 =121,2 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =31,8 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

time (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 c+t	C18:2 c+t	C18:3 n6	C18:3 n3	C24:0	others	UI
86	0,42	11,55	1,28	5,15	27,38	11,79	7,23	0,47	15,12	19,61	0,75
163	0,58	13,05	1,08	5,08	30,11	12,89	13,16	0,25	7,19	16,60	0,97
227	0,57	13,17	0,83	5,30	31,29	14,69	19,24	0,24	7,57	7,10	1,20

Τα ολικά λιπίδια του υπό μελέτη μύκητα περιείχαν λιπαρά οξέα με 10 έως 24 άτομα άνθρακα τα κυριότερα από τα οποία ήταν τα κορεσμένα το μυριστικό (C14:0), παλμιτικό (C16:0) και στεατικό (C18:0), το τετρακοζανοϊκό (C:24)το μονοακόρεστο ελαιϊκό (C18:1) που ήταν και το μείζον συστατικό και τα πολυακόρεστα λινελαϊκό (C18:2) και γ-λινολενικό (GLA). Σε χαμηλότερα ποσοστά βρέθηκαν βρέθηκαν οξέα όπως, παλμιτελαϊκό, αραχιδικό και σε ορισμένες περιπτώσεις βαξενικό και εικοσιδυοενοϊκό. Από τον πίνακα 4.5.1. βλέπουμε με την εξέλιξη της ζύμωσης το ποσοστό του γ-λινολενικού οξέος αυξάνεται σε σημαντικό βαθμό και προς το τέλος της βιομετατροπής το ποσοστό του είναι 19,24% επί των ολικών λιπιδίων με ταυτόχρονη σημαντική αύξηση του ποσοστού του παλμιτικού (C16:0) και του στεατικού (C18:0) οξέος. Το ποσοστό του γ-λινολενικού παρουσιάζει την μέγιστη συγκέντρωση (19,24 %) στις 227 h. Την ίδια περίπου εξέλιξη με το γ-λινολενικό οξύ παρουσιάζει το ελαιϊκό (C18:1) και το λινελαϊκό (C18:2) οξύ. Τέλος υπολογίστηκε δείκτης ακορεστότητας (UI%). Στον πίνακα 4.5.1 φαίνεται ότι κατά την εξέλιξη της βιομετατροπής παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στο ποσοστό του δείκτη ακορεστότητας λόγω της μείωσης του ελαιϊκού (C18:1), του λινελαϊκού (C18:2) και του γ-λινολενικού οξέος (C18:3).

Η απεικόνιση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%) του μύκητα *T. elegans* στο υπόστρωμα της μελάσας φαίνεται στο γράφημα 4.5.1.γ. Στο γράφημα αυτό είναι εμφανής η αυξομείωση του γ-λινολενικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

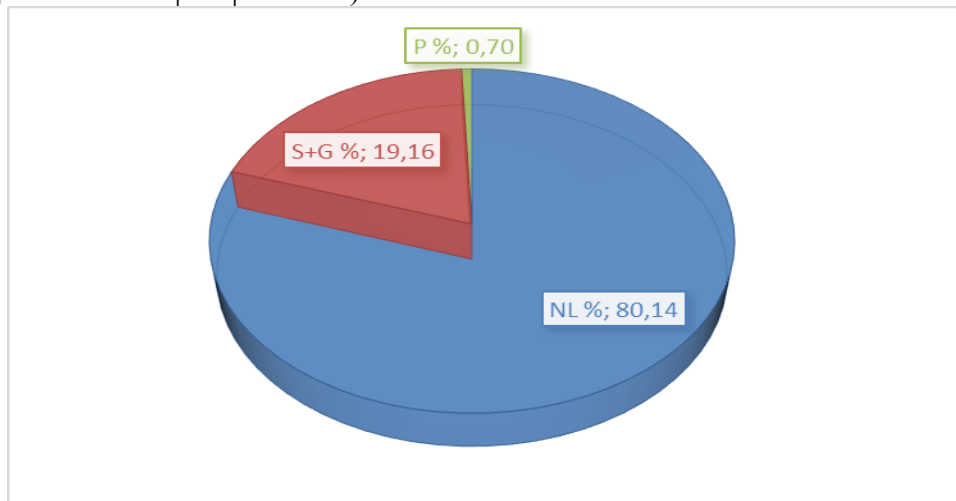


Γράφημα 4.4.1.γ Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%): Μυριστικό οξύ (C14:0), Παλμυτικό οξύ (C16:0), Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), Στεατικό οξύ (C18:0), Ελαϊκό οξύ (C18:1), Λινελαϊκό οξύ (C18:2) α-λινολενικό (C18:3n3) και γ-λινολενικό οξύ (C18:3n6) και λοιπών οξέων, του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS0 =121,2 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =31,8 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Εκτός από την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%), πραγματοποιήθηκε στο στάδιο αυτό η ανάλυση του μικροβιακού λίπους στα επιμέρους κλάσματα των ουδέτερων λιπιδίων, των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων.

Το γράφημα 4.5.1.δ. παρουσιάζει τα ποσοστά των κλασμάτων επί των ολικών λιπιδίων στις 271 h της βιομετατροπής. Από το γράφημα αυτό είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό επί του συνόλου των λιπιδίων (TFA), ενώ τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (S+G) και ιδιαίτερα τα φωσφολιπίδια (P) απαντώνται σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό (P=0,7%).

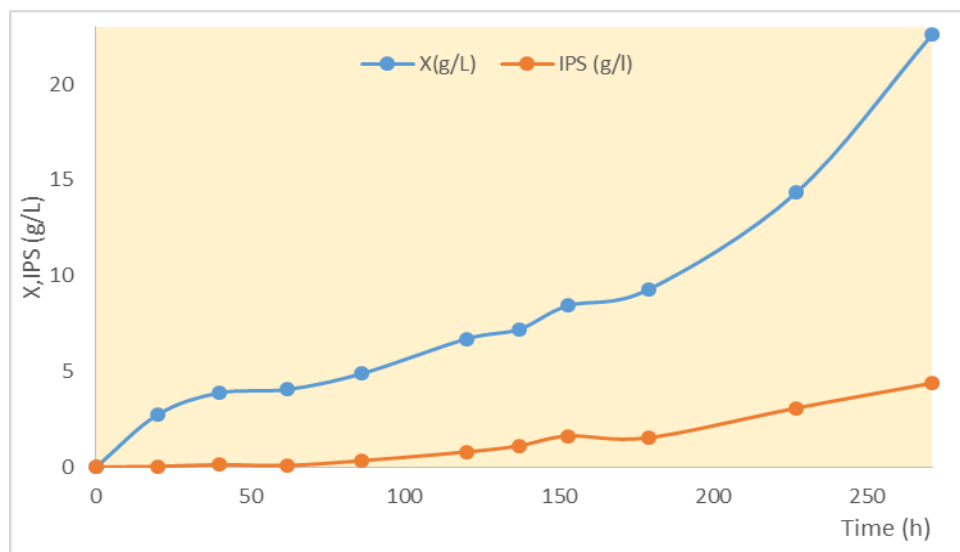
Επομένως η περιεκτικότητα του μυκηλίου σε λιπίδια έδειξε ότι τα ουδέτερα λιπίδια ήταν το κυρίαρχο λιπιδιακό κλάσμα σε σχέση με τα πολικά λιπίδια (γλυκολιπίδια, σφιγγολιπίδια και φωσφολιπίδια).



Γράφημα 4.5.1.δ. Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TFA) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα στην χρονική περίοδο των 271 h της βιομετατροπής. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS0 =121,2 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =31,8 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

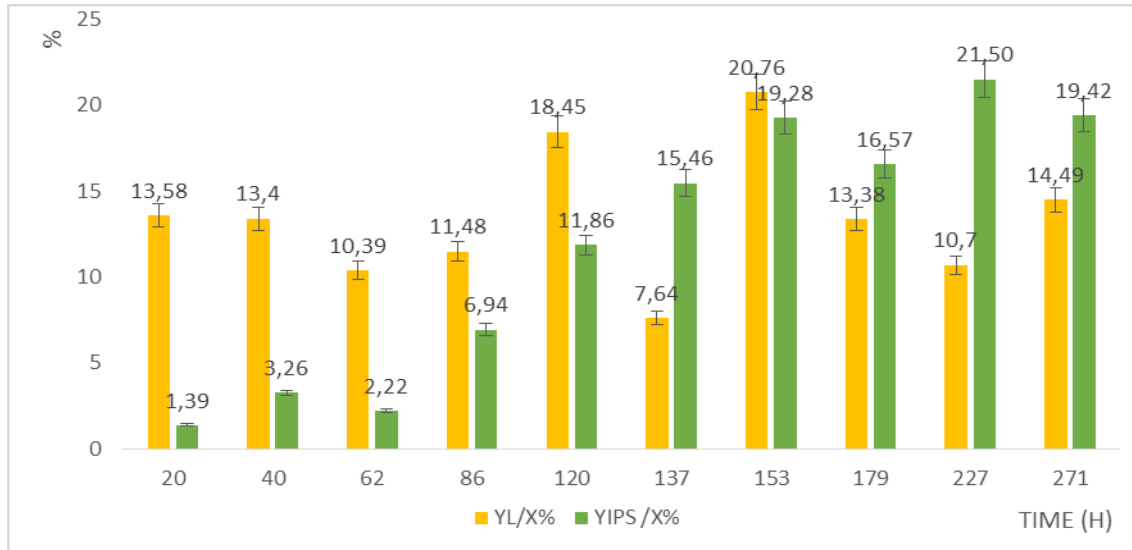
4.5.2. Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου και ανά μονάδα βιομάζας.

Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Η κινητική μελέτης στις συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών και της παραγόμενης βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=120 g/L) απεικονίζεται στο γράφημα 4.5.2.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει σημαντική συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών με μέγιστη συγκέντρωση 4,39 g/L περί τις 271 h.



Γράφημα 4.5.2.α Κινητική μελέτης στις συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών και της παραγόμενης βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (120 g/L). Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS₀ =121,2 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =31,8 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

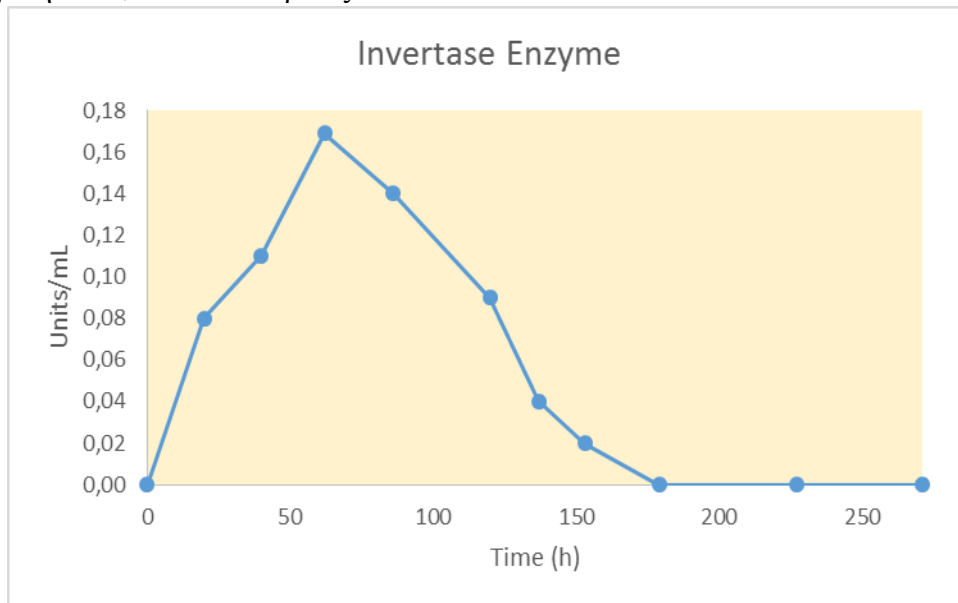
Όπως φαίνεται από τα δεδομένα της άνω κινητικής η παραγωγή IPS σε g/L αυξανόταν συνεχώς μέχρι τις 271 h της βιομετατροπής. Επίσης η ποσότητα των ενδοπολυσακχαριτών ανά μονάδα βιομάζας ($Y_{IPS/X\%}$, w/w) αρχικά αυξανόταν με το χρόνο καλλιέργειας *Thamnidium elegans* (Γράφημα 4.5.2.β) στη συνέχεια όμως υπήρξε μικρή αυξομείωση του ποσοστού τους. Συγκρίνοντας τον συντελεστή απόδοσης ενδοπολυσακχαριτών IPS, ($Y_{IPS/X\%}$) και τον αντίστοιχο του ενδοκυτταρικού λίπους ($Y_{L/X\%}$) ως προς την παραγόμενη βιομάζα είναι εμφανές ότι ο $Y_{IPS/X\%}$ φέρει την μέγιστη τιμή του στις 227 h και ακολουθεί ανάλογη αυξομείωση με τον $Y_{L/X\%}$ ο οποίος έλαβε την μέγιστη τιμή του στις 153 h της βιομετατροπής.



Γράφημα 4.5.2.β Συντελεστής απόδοσης IPS, YIPS /X% και ενδοκυτταρικού λίπους (YL /X%) ως προς την παραγόμενη βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grml) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS0 =121,2 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =31,8 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

4.5.3. Προσδιορισμός ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμβεργτάσης.

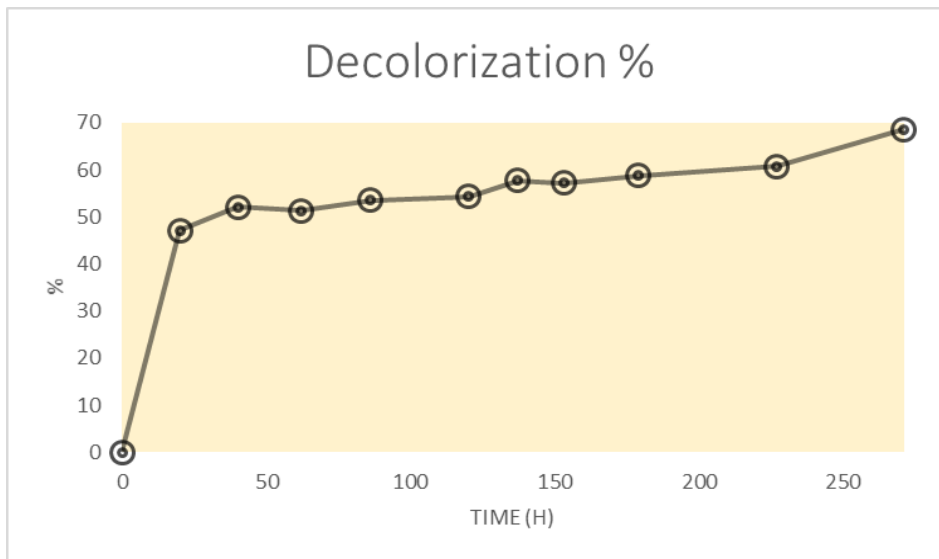
Κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS0=120 g/L) πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβεργτάσης ο οποίος απεικονίζεται στο γράφημα 4.5.3. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα 0,17 U/mL περί τις 62 h.



Γράφημα 4.5.3. Προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβεργτάσης κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grml) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS0 =121,2 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =31,8 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

4.5.4. Προσδιορισμός βαθμού αποχρωματισμού υποστρώματος.

Τέλος πραγματοποιήθηκε μέλετη της εξέλιξης του αποχρωματισμού του θρεπτικού μέσου (Γράφημα 4.5.4). Κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής παρατηρήθηκε αποχρωματισμός του μέσου με μέγιστο ποσοστό 69% περί των 271 h. Το γεγονός αυτό δείχνει την ικανότητα στους στελέχους *Thamnidium elegans* να διασπάει τις μελανοιδίνες καθώς και υπολοιπες χρωστικές ουσίες του υποστρώματος. Η εξέλιξη του αποχρωματισμού του μέσου καλλιέργειας με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS₀=120 g/L) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρουσιάζεται αναλυτικά στο επόμενο γράφημα.

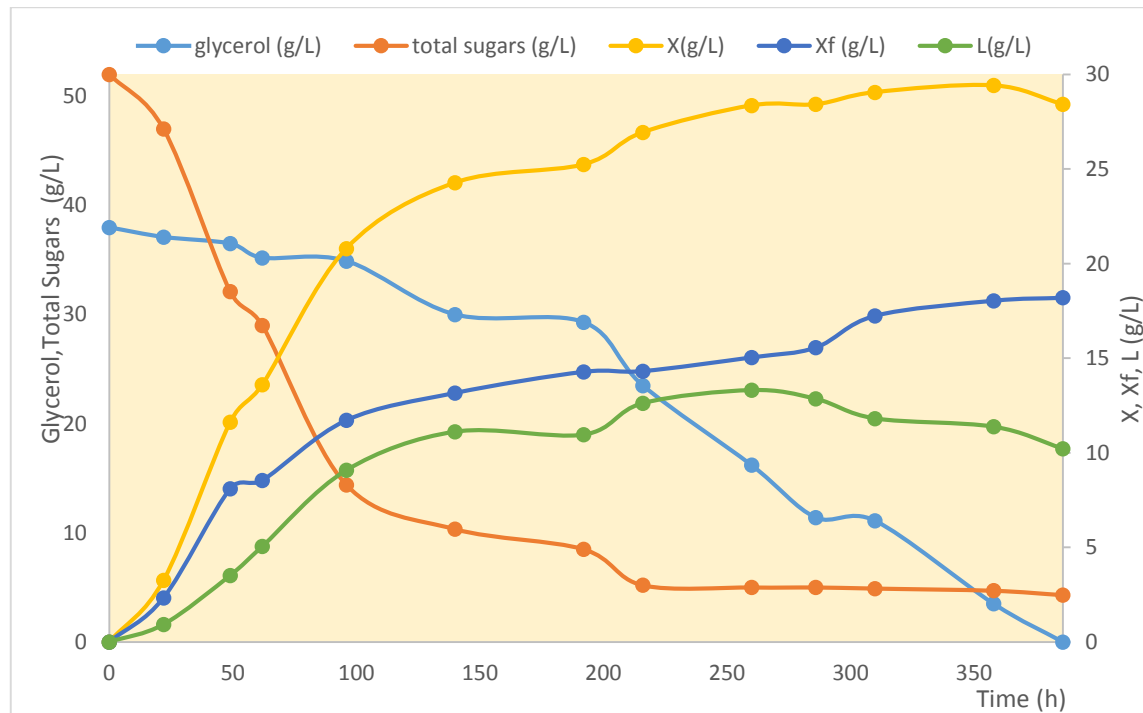


Γράφημα 4.5.4 Η εξέλιξη του αποχρωματισμού του μέσου καλλιέργειας του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη μελάσα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση σακχάρων μελάσας (TS₀ =121,2 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =31,8 g/L) , υπό αερόβιες συνθήκες.

4.6. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε συνδιασμό υποστρώματος μελάσας ($TS_{molasses}=50 \text{ g/L}$) και γλυκερόλης ($S_{glycerol}=40 \text{ g/L}$)

4.6.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με πηγή άνθρακα τον συνδιασμό δύο αποβήτων, τη μελάσα ($TS_0=50 \text{ g/L}$) και την γλυκερόλη ($S_0=40 \text{ g/L}$) απεικονίζεται στο γράφημα 4.6.1.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει σημαντική κυτταρική αύξηση με μέγιστη παραγωγή βιομάζας $29,42 \text{ g/L}$ περί τις 358 h.

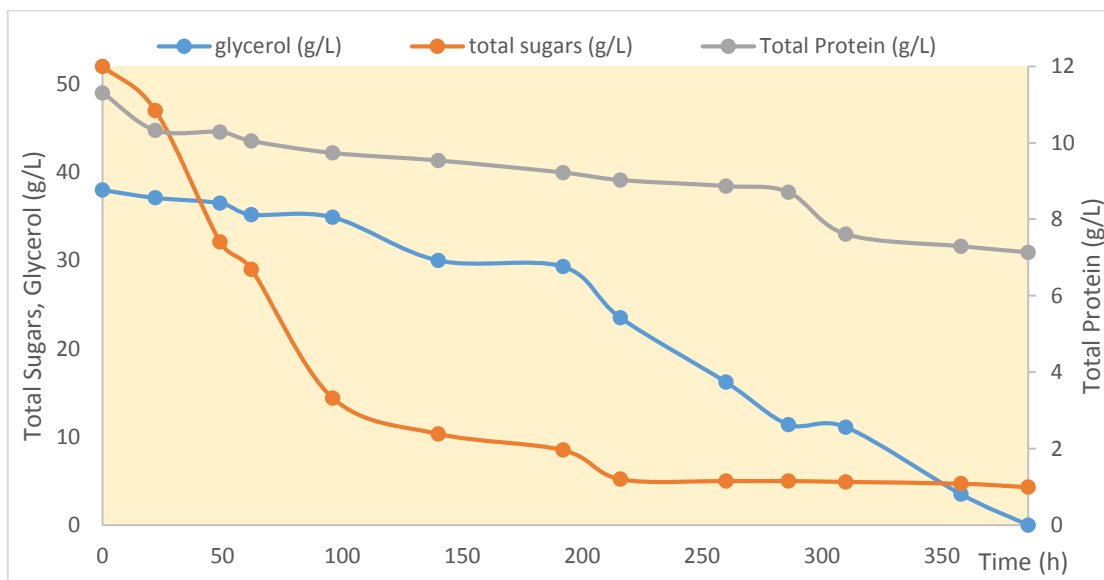


Γράφημα 4.6.1α Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης, σακχάρων υποστρώματος, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, και της ελεύθερης λίπους βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με τον συνδιασμό μελάσας και γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία $T=27 \text{ }^\circ\text{C}$, αρχική συγκέντρωση μελάσας ($TS_0 = 52 \text{ g/L}$), αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ($S_0 = 38 \text{ g/L}$) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein = $11,3 \text{ g/L}$), υπό αερόβιες συνθήκες.

Η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και πραγματοποιείται εξάντληση της πηγής άνθρακα στις 386 h. Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους από τον εν λόγω μύκητα στο παρόν υπόστρωμα χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα υψηλή και φέρει μέγιστη τιμή $13,31 \text{ g/L}$, με συντελεστή απόδοσης ($Y_{L/X}$) 47% ($0,47 \text{ g}$ λίπους ανά g παραγόμενης βιομάζας). Ο συνδιασμός των δυο αποβλήτων ως πηγή άνθρακα εκ του υποστρώματος έγινε με στόχο να αυξηθεί ο λόγος C/N ($C/N=60 \text{ mol/mol}$) ο οποίος, στις ζυμώσεις που έλαβαν χώρα με την μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του υποστρώματος σε πρωτεΐνη χαρακτηριζόταν από χαμηλότερες τιμές αποτελώντας τροχοπέδη στην παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους.

Παράλληλα με την κατανάλωση των σακχάρων εκ του υποστρώματος παρατηρείται και ταυτόχρονη κατανάλωση της πρωτεΐνης που περιέχει η μελάσα. Δεδομένου του

γεγονότος μια τυπική πρωτεΐνη, όπως και η σακχαρόζη που αποτελεί το κύριο συστατικό της μελάσας, περιέχει 40 % w/w άνθρακα (Αγγελής, 2007), σε ό,τι αφορά το ποσοστό του άνθρακα μπορεί να θεωρηθεί κατά προσέγγιση ότι 1 g αναλωθείσης πρωτεΐνης αντιστοιχεί με 1 g αναλωθείσης σακχαρόζης. Το ίδιο ακριβώς ισχύει και για την γλυκερόλη δεδομένου ότι περιέχει περίπου 40 % w/w άνθρακα. Κατά την αρχή της βιομετατροπής παρατηρείται μεγαλύτερη κατανάλωση των σακχάρων εκ του υποστρώματος από τον μικροοργανισμό ενώ η κατανάλωση της πρωτεΐνης καθίσταται περιορισμένη.



Γράφημα 4.6.1β Κινητική της εξέλιξης της κατανάλωσης γλυκερόλης, σακχάρων και πρωτεΐνης υποστρώματος, συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με τον συνδιασμό μελάσας και γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία $T=27\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση μελάσας ($TS_0 = 52\text{ g/L}$), αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ($S_0 = 38\text{ g/L}$) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος ($Total\ Protein = 11,3\text{ g/L}$), υπό αερόβιες συνθήκες.

Γίνεται όμως απόλυτα σαφές ότι στις περί των 192 h της βιομετατροπής όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος σε σάκχαρα έχει κατέλθει στα 8,5 g/L ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκερόλης (Γράφημα 4.6.1β) εκ του υποστρώματος αυξάνεται σημαντικά γεγονός που υποδεικνύει ότι όταν οι συνθήκες καλλιέργειας καθίστανται περιοριστικές σε συγκέντρωση σακχάρων αρχίζει η κατανάλωση της γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα.

Στις 386 h η συνολική κατανάλωση πρωτεΐνης από τον μικροοργανισμό ανέρχεται στα 4,16 g/L ενώ μετά το πέρας των 386 h η συγκέντρωση των σακχάρων του υποστρώματος έχει κατέλθει στα 4,3 g/L και παρατηρείται πλήρης κατανάλωση της γλυκερόλης με αποτέλεσμα να αδυνατούν να καλύψουν τις βιοσυνθετικές απαιτήσεις σε ενέργεια του μικροοργανισμού.

Κατά την πραγματοποιηθείσα βιομετατροπή ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας - υποστρώματος ήταν της τάξης των 0.32 g παραγόμενης ξηράς βιομάζας ανά 1 g καταναλισκομένου ισοδύναμου σακχάρου ($Y_{x/s}=32\%$). Επίσης, στο γράφημα 4.6.1.α. απεικονίζεται η παράμετρος X_f (g/L), η οποία αντιπροσωπεύει την ελεύθερη λίπους βιομάζα. Ταυτόχρονα με τη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους, ο μύκητας εμφανίζει σημαντική κυτταρική αύξηση με αποτέλεσμα η παράμετρος X_f να αυξάνεται μέχρι τις 260 h περίπου στις οποίες λαμβάνει και την μέγιστη τιμή της ($X_{f\max}=15,05\text{g/L}$).

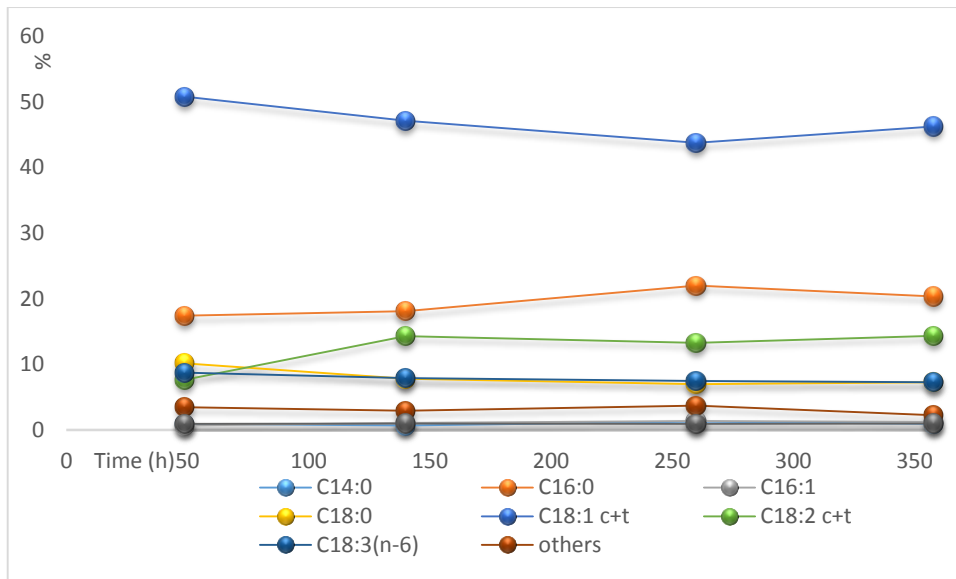
Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε σε επιλεγμένα σημεία της συγκεκριμένης βιομετατροπής. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 4.6.1.

Πίνακας 4.6.1. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας και γλυκερόλης. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (S₀ =52 g/L), αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (S₀ =38 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =11,3 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

Time (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 c+t	C18:2 c+t	C18:3(n-6)	others	UI
49	0,93	17,45	0,72	10,18	50,79	7,68	8,76	3,49	0,93
140	0,68	18,12	1,08	7,82	47,14	14,30	7,91	2,96	1,01
260	1,28	22,02	1,36	6,99	43,79	13,30	7,50	3,75	0,94
358	0,94	20,34	1,24	7,29	46,28	14,36	7,31	2,24	0,98

Τα ολικά λιπίδια του υπό μελέτη μύκητα περιείχαν λιπαρά οξέα με 10 έως 24 άτομα άνθρακα τα κυριότερα από τα οποία ήταν τα κορεσμένα το μυριστικό (C14:0), παλμιτικό (C16:0) και στεατικό (C18:0), το μονοακόρεστο ελαϊκό (C18:1) που ήταν και το μείζον συστατικό και τα πολυακόρεστα λινελαϊκό (C18:2) και γ-λινολενικό (GLA, C18:3n6). Σε χαμηλότερα ποσοστά βρέθηκαν βρέθηκαν οξέα όπως, παλμιτελαϊκό, αραχιδικό και σε ορισμένες περιπτώσεις βαξενικό και εικοσιδυοενοϊκό. Από τον πίνακα 4.6.1. βλέπουμε με την εξέλιξη της ζύμωσης το ποσοστό του γ-λινολενικού μειώνεται με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού του παλμιτελαϊκού (C16:1), του λινελαϊκού (C18:2) και του παλμιτικού (C16:0) οξέος. Το ποσοστό του γ-λινολενικού παρουσιάζει την μέγιστη συγκέντρωση (8,76 %) επί των συνολικών λιπαρών οξέων στις 49 h. Τέλος υπολογίστηκε δείκτης ακορεστότητας (UI). Όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο περισσότερο ακόρεστα είναι τα λιπίδια και τόσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης ακορεστότητας. Στον πίνακα 4.6.1 φαίνεται ότι κατά την εξέλιξη της βιομετατροπής από τις 49h έως τις 358 h παρατηρείται αυξομείωση της ακορεστότητας των λιπαρών οξέων εξαιτίας της μείωσης του ελαϊκού (C18:1) και του γ-λινολενικού οξέος (C18:3n6) και αύξησης του παλμιτελαϊκού (C16:1) και του λινελαϊκού (C18:2) οξέος.

Η απεικόνιση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%) του μύκητα *T. elegans* στο υπόστρωμα μελάσας-γλυκερόλης φαίνεται στο γράφημα 4.6.1.γ. Στο γράφημα αυτό είναι εμφανής η μείωση του γ-λινολενικού οξέος κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής.

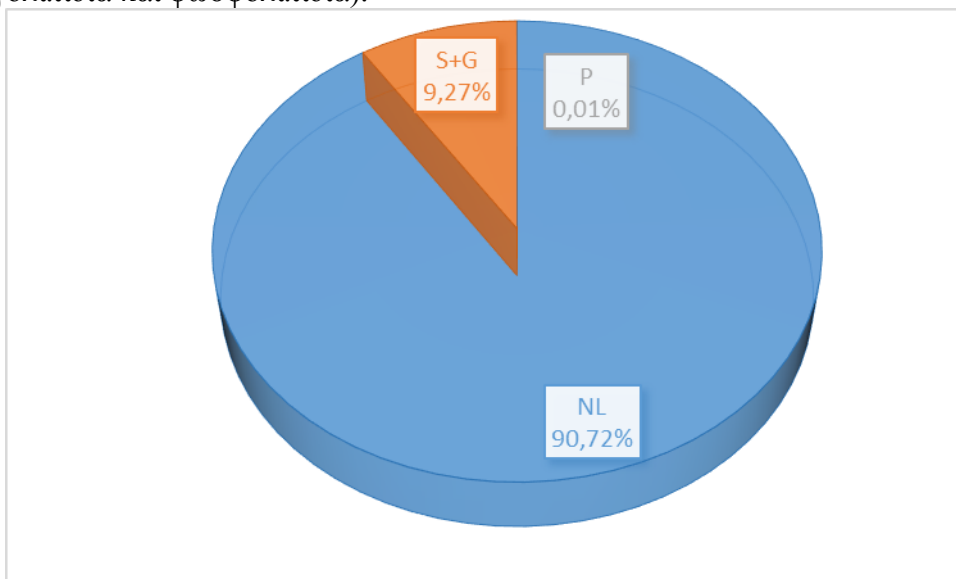


Γράφημα 4.6.1.γ Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%): Μυριστικό οξύ (C14:0), Παλμιτικό οξύ (C16:0), Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), Στεατικό οξύ (C18:0), Ελαϊκό οξύ (C18:1), Λινελαϊκό οξύ (C18:2) και γ-λινολενικό οξύ (C18:3n6) και λοιπών οξέων, του Ζυγομήκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας και γλυκερόλης. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS0 =52 g/L), αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (S0 =38 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =11,3 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες

Εκτός από την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%), πραγματοποιήθηκε στο στάδιο αυτό η ανάλυση του μικροβιακού λίπους στα επιμέρους κλάσματα των ουδέτερων λιπιδίων, των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων.

Το γράφημα 4.6.1.δ. παρουσιάζει τα ποσοστά των κλασμάτων επί των ολικών λιπιδίων στις 310 h της βιομετατροπής. Από το γράφημα αυτό είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό επί του συνόλου των λιπιδίων (TFA), ενώ τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (S+G) και ιδιαίτερα τα φωσφολιπίδια (P) απαντώνται σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό (P=0,01%).

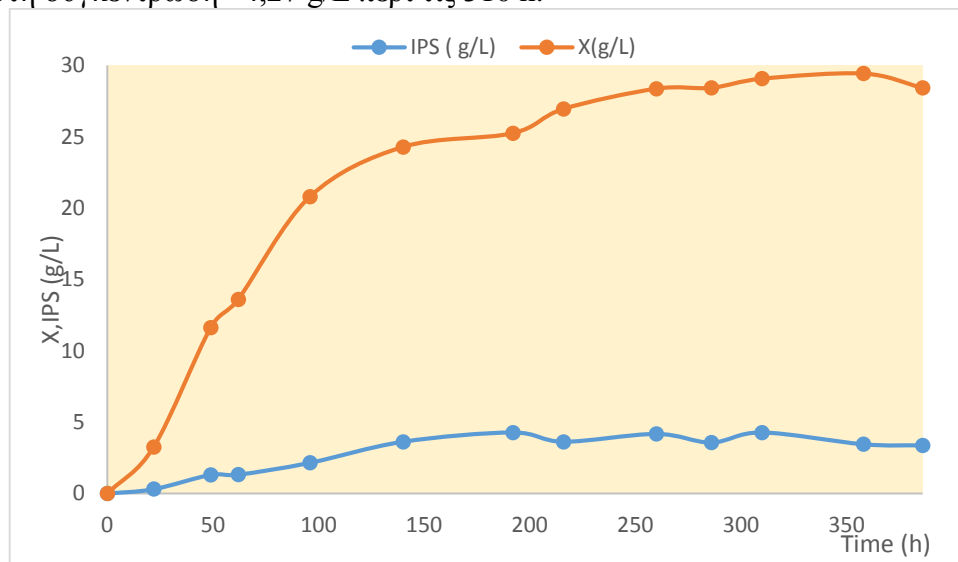
Επομένως η περιεκτικότητα του μυκηλίου σε λιπίδια έδειξε ότι τα ουδέτερα λιπίδια ήταν το κυρίαρχο λιπιδιακό κλάσμα σε σχέση με τα πολικά λιπίδια (γλυκολιπίδια, σφιγγολιπίδια και φωσφολιπίδια).



Γράφημα 4.6.1.δ. Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφίγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TL) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας και γλυκερόλης. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grm) και θερμοκρασία $T=27\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση μελάσας ($TS_0=52\text{ g/L}$), αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ($S_0=38\text{ g/L}$) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =11,3 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες.

4.6.2. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου και ανά μονάδα βιομάζας.

Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Η κινητική μελέτης στις συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών και της παραγόμενης βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με πηγή άνθρακα τη μελάσα ($TS_0=50\text{ g/L}$) και τη γλυκερόλη ($S_{\text{glol}}=40\text{ g/L}$) απεικονίζεται στο γράφημα 4.6.2.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει σημαντική συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών με μέγιστη συγκέντρωση $4,27\text{ g/L}$ περί τις 310 h.

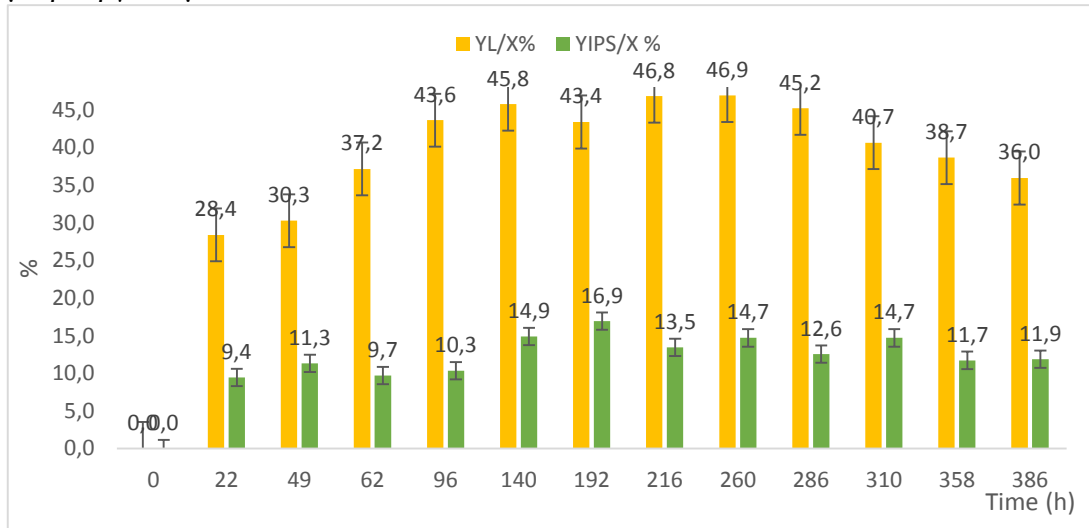


Γράφημα 4.6.2.α Κινητική μελέτης στις συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών και της παραγόμενης βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του *elegans* σε υπόστρωμα μελάσας και γλυκερόλης. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grm) και θερμοκρασία $T=27\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση μελάσας ($TS_0=52\text{ g/L}$), αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ($S_0=38\text{ g/L}$) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =11,3 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα της άνω κινητικής η συγκέντρωση των IPS σε g/L αυξανόταν συνεχώς μέχρι τις 310 h της στη συνέχεια όμως ακολουθεί μείωση-ανακατανάλωση των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (Γράφημα 4.6.2.α).

Επίσης η ποσότητα των ενδοπολυσακχαριτών ανα μονάδα βιομάζας ($Y_{\text{IPS}}/X\%$, w/w) αρχικά αυξανόταν με το χρόνο καλλιέργειας *Thamnidium elegans* λαμβάνοντας μέγιστη τιμή του $Y_{\text{IPS}}/X_{\text{max}}=16,9\%$ περί των 192h στη συνέχεια όμως υπήρξε μείωση-ανακατανάλωση των ήδη συσσωρευμένων ενδοπολυσακχαριτών. Συγκρίνοντας τον συντελεστή απόδοσης παραγόμενων IPS ($Y_{\text{IPS}}/X\%$) και τον αντίστοιχο του ενδοκυτταρικού λίπους ($Y_L/X\%$) ως προς την παραγόμενη βιομάζα (Γράφημα 4.6.2.β) είναι εμφανές ότι ο συντελεστής $Y_L/X\%$ υπερέρχει σημαντικά σε ποσοστό επί της

παραγομενης βιομάζας σε σχέση με τον ΥΙΡS /X% γεγονός που οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα συσσώρευσης ενδοκυτταρικών λιπιδίων στη βιομάζα του μικροοργανισμού.

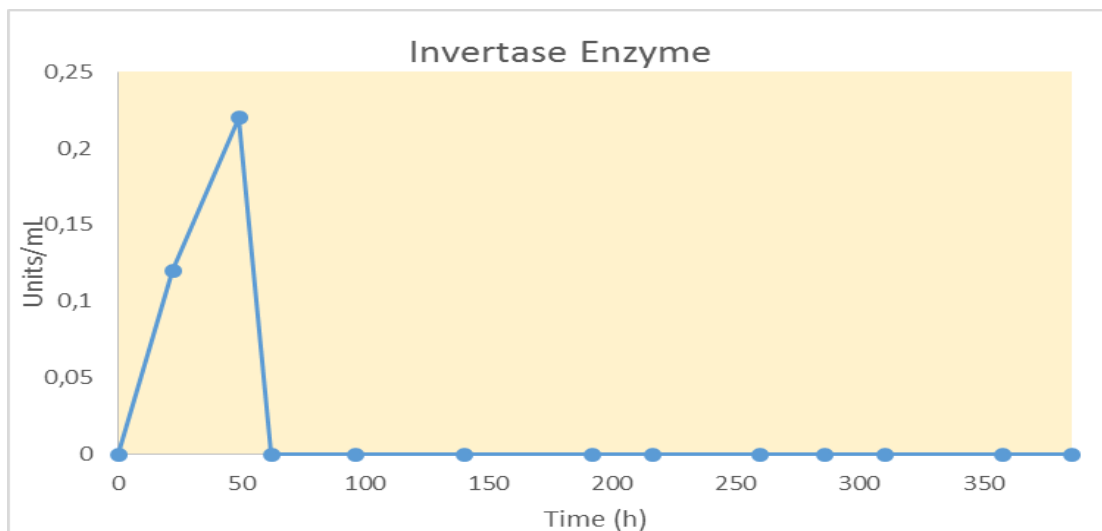


Γράφημα 4.6.2.β Συντελεστής απόδοσης παραγομένων ΙΡS ΥΙΡS /X% και ενδοκυτταρικού λίπους (YL /X%) ως προς την παραγομένη βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο της βιομετατροπής από το μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας και γλυκερόλης. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 ml) και θερμοκρασία T=27 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (TS0 =52 g/L), αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (S0 =38 g/L) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =11,3 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες

Σε επόμενο στάδιο έγινε ανάλυση των παραγομένων ενδοπολυσακχαριτών με στόχο την ανίχνευση των δομικών τους μονάδων. Όσο αφορά τον ποιοτικό τους προσδιορισμό, συνίστανται από δομικές μονάδες γλυκόζης, φρουκτόζης.

4.6.3. Προσδιορισμός ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμβερτάσης.

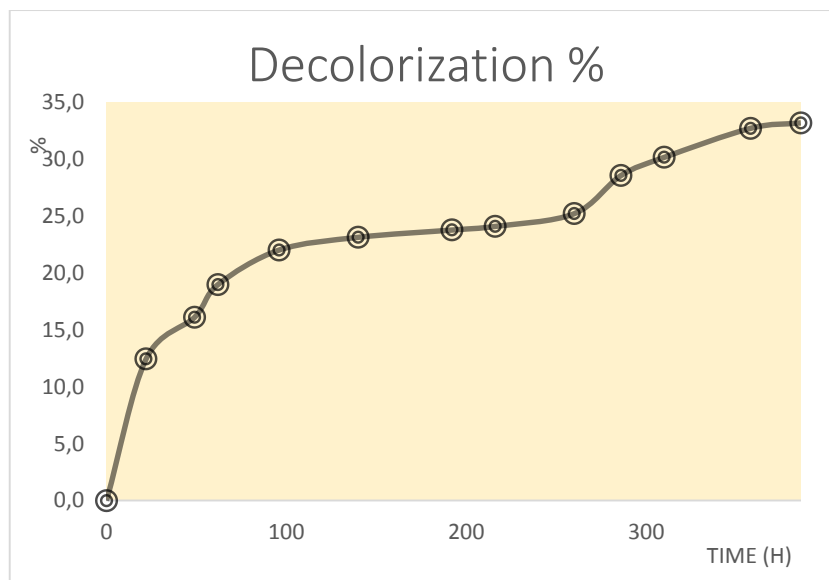
Κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μέσο αύξησης με πηγή άνθρακα τη μελάσα (TS0=50 g/L) και τη γλυκερόλη (S0 =40 g/L) πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης ο οποίος απεικονίζεται στο γράφημα 4.6.3. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα 0,22 U/mL περί τις 49 h.



Γράφημα 4.6.3. Προσδιορισμός της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας και γλυκερόλης. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία $T=27\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση μελάσας ($TS_0=52\text{ g/L}$), αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ($S_0=38\text{ g/L}$) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =11,3 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες

4.6.4. Προσδιορισμός βαθμού αποχρωματισμού υποστρώματος.

Τέλος πραγματοποιήθηκε μελέτη της εξέλιξης του αποχρωματισμού του θρεπτικού μέσου. Κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής παρατηρήθηκε αποχρωματισμός του μέσου με μέγιστο ποσοστό 33,2 % περί των 386 h. Το γεγονός αυτό δείχνει την ικανότητα του στελέχους *Thamnidium elegans* να διασπάει τις μελανοιδίνες καθώς και υπόλοιπες χρωστικές ουσίες του υποστρώματος. Η εξέλιξη του αποχρωματισμού του μέσου καλλιέργειας (Γράφημα 4.6.4) με πηγή άνθρακα τη μελάσα ($TS_0=50\text{ g/L}$) και την γλυκερόλη ($S_0=40\text{ g/L}$) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρουσιάζεται αναλυτικά στο επόμενο γράφημα.



Γράφημα 4.6.4 Η εξέλιξη του αποχρωματισμού του μέσου καλλιέργειας του μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα μελάσας και γλυκερόλης. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 rpm) και θερμοκρασία $T=27\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση μελάσας ($TS_0=52\text{ g/L}$), αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ($S_0=38\text{ g/L}$) και αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης υποστρώματος (Total Protein =11,3 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες

5. Συζήτηση.

Στη σημερινή εποχή η διαχείριση και η επεξεργασία των βιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων αποτελεί σημαντικό και δυσεπίλυτο πρόβλημα καθώς ο όγκος τους αυξάνει ραγδαία τα τελευταία χρόνια με άμεσες δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Είναι γεγονός ότι περίπου το 15% w/w όλων των εδώδιμων προϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων απολήγουν στην κατηγορία των αποβλήτων. Ακόμη σε ότι αφορά τις βιομηχανίες βιοκαυσίμων ολοένα και αυξάνουν σε αριθμό λόγω της μεγάλης ζήτησης, επομένως η διάθεση της γλυκερόλης που προκύπτει ως παραπροϊόν των εν λόγω διεργασιών παραμένει ένα άλυτο πρόβλημα για τη βιομηχανία και το περιβάλλον.

Εκτός όμως από τις αρνητικές επιπτώσεις τους στο περιβάλλον απόβλητα και παραπροϊόντα δύναται να αποτελούν πηγή πολύτιμων θρεπτικών συστατικών με μεγάλες προοπτικές αξιοποίησης οι οποίες αποσκοπούν στην ανάκτηση, στην ανακύκλωση και στην βιωσιμότητα των συστατικών των αποβλήτων και των παραπροϊόντων διαμέσου της βιομετατροπής τους σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Η χρήση των βιομηχανικών υποπροϊόντων ως υποστρώματων για την παραγωγή μικροβιακών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον διότι τα υποπροϊόντα αυτά παράγονται σε πολύ μεγάλες ποσότητες, ενώ η διαχείρισή τους αποτελεί δυσεπίλυτο πρόβλημα για τη βιομηχανία (Peters, 2006; Koutinas *et al.*, 2014). Η βιοτεχνολογία προσφέρει πολλούς εναλλακτικούς τρόπους αξιοποίησης των αποβλήτων και παραπροϊόντων, οι οποίοι χαρακτηρίζονται φιλικόι προς το περιβάλλον. Μέχρι στιγμής έχουν αναπτυχθεί αρκετές βιοτεχνολογικές διεργασίες, με σπουδαιότερες τις μικροβιακές ζυμώσεις, για την αξιοποίησή των παραπροϊόντων. Τα παραπροϊόντα μπορούν να αντικαταστήσουν τα καθαρά σάκχαρα ως πρώτη ύλη στις μικροβιακές ζυμώσεις, συμβάλλοντας στη μείωση του κόστους των βιοδιεργασιών (Peters, 2006; Lin *et al.*, 2015). Επομένως, η χρήση των βιομηχανικών αποβλήτων και παραπροϊόντων ως υποστρώματα για την παραγωγή μικροβιακών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της αλματώδους αύξησης και της εντατικοποίησης της γεωργο-βιομηχανικής παραγωγής.

Η χρήση των ανανεώσιμων γεωργικών και βιομηχανικών απόβλητων ως πρώτες ύλες για την παραγωγή ζυμώσιμων υλικών βοηθούν στη μείωση του κόστους παραγωγής (Zahari *et al.*, 2012). Παρά το μεγάλο αριθμό μελετών που έχει εμφανιστεί στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την αξιοποίηση των γεωργο-βιομηχανικών παραπροϊόντων, η έρευνα γύρω από τα ζητήματα της βιομετατροπής τους συνεχίζεται με αμείωτο ενδιαφέρον (Peters, 2006; Koutinas *et al.*, 2014).

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να παράγουν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως τα μικροβιακά λιπίδια, από βιομηχανικά και γεωργο-βιομηχανικά παραπροϊόντα μπορεί να θεωρηθεί ως μια εναλλακτική λύση στη διαχείριση αυτών των αποβλήτων. Τα λιπίδια των μικροοργανισμών παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για τη φυσιολογία του μικροβιακού κυττάρου αφού αποτελούν δομικά συστατικά και αποθηκευτικά μόρια των κυττάρων. Εκτός όμως από το φυσιολογικό ρόλο των λιπιδίων, η σημασία των λιπιδίων είναι μεγάλη και για την εφαρμοσμένη έρευνα αφού αποτελούν άριστες πηγές πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs). Τα PUFAs λόγω των βιολογικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους καθίστανται περιζήτητα

στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων. Ακόμη, τα PUFAs κατέχουν ένα σημαντικό βιοχημικό ρόλο στη ρύθμιση των λειτουργιών της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και στην παραγωγή διαφόρων μεταβολιτών οι οποίοι ρυθμίζουν ποικίλες ζωτικές βιολογικές διεργασίες. Εξάλλου, η παρουσία τους καθίσταται απαραίτητη στη διατροφή του ανθρώπου προκειμένου να γίνουν σωστά όλες οι οργανικές λειτουργίες και να αποφευχθούν τυχόν ελλείψεις και παθήσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (Certik & Shimizu, 1999) καθώς σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες φέρουν αντικαρκινικές ιδιότητες.

Τα λιπίδια των μυκήτων συνιστούν εξαιρετικές πηγές πολυακορεστών λιπαρών οξέων, αφού η βιοσυνθετική ικανότητα των μυκήτων είναι τέτοια που τους επιτρέπει να παράγουν μια τεράστια ποικιλία πολυακορεστών λιπαρών οξέων σε μεγάλες ποσότητες (Ratledge, 1994; Čertik & Shimizu., 1999; Ratledge *et al.*, 2005).

Η διαδικασία παραγωγής μικροβιακού λίπους από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα λόγω του σχετικά μικρού κύκλου ζωής τους, της ικανότητας τους να καλλιεργηθούν χωρίς να επηρεαστούν σημαντικά από την τοποθεσία, την εποχή, το κλίμα, καθώς και της ευκολίας τους να καλλιεργηθούν σε μεγάλη κλίμακα (Meng *et al.*, 2009) . Όπως είναι ήδη γνωστό από πολλές βιβλιογραφικές μελέτες, οι μύκητες της κλάσης των Ζυγομυκήτων κατά την αύξηση τους σε σακχαρούχα και συναφή αυτών ανανεώσιμα υποστρώματα δύνανται να συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους, το οποίο περιέχει σε ποικίλα ποσά το υψηλής διατροφικής και φαρμακευτικής αξίας γ -λινολενικό οξύ (GLA, C18:3, ω -6) (Certik *et al.*, 1988; Fakas *et al.*, 2008b; Chen & Chang, 1996; Kavadia *et al.*, 2001). Επιπλέον, το GLA συνιστά φυλογενετικό χαρακτηριστικό για τους ζυγομύκητες (Ratledge, 1994). Επομένως καθίσταται απόλυτα σαφές ότι η παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως τα λιπίδια των Ζυγομυκήτων, μπορεί να προσφέρει μια οικονομικά βιώσιμη λύση.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η βιοφυσιολογική και βιοχημική συμπεριφορά του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* CCF-1465 κατά την καλλιέργεια του σε ανανεώσιμα υποστρώματα χαμηλού κόστους. Τα μεταβολικά προϊόντα η παραγωγή των οποίων ενδιέφερε στην παρούσα μελέτη ήταν η κυτταρική μάζα, οι ενδοπολυσακχαρίτες και τα κυτταρικά λιπίδια. Ο μικροοργανισμός της παρούσας μελέτης είναι ένα στέλεχος του οποίου δεν έχει μέχρι στιγμής η βιοσυνθετική του ικανότητα σε υπόστρωμα με βάση τη μελάσα ή/και το συνδυασμό αυτής με την γλυκερόλη.

Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 6 ζυμώσεις βυθού με τις εξής αρχικές συγκεντρώσεις συνολικών σακχάρων (TS₀) ως πηγής άνθρακα: 50 g/L, 80 g/L, 100 g/L και 120 g/L μελάσα, 50 g/L σουκρόζη και TS₀=50 g/L μελάσα :40 g/L γλυκερόλη προκειμένου να ανέλθει ο λόγος C/N σε υψηλότερα επίπεδα για να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους.

Με βάση τα αποτελέσματα των κινητικών, είναι εμφανές ότι η μελάσα, η σακχαρόζη και ο συνδυασμός μελάσας-γλυκερόλης αποδείχθηκαν ιδιαίτερα ευνοϊκά μέσα ανάπτυξης για τον *Thamnidium elegans* καθώς και ιδιαίτερα υψηλά ποσά βιομάζας παράχθηκαν κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στα εν λόγω υποστρώματα. Η παραγωγή βιομάζας κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού αυτού χαρακτηρίζεται ιδιαίτερος ικανοποιητική. Σε υπόστρωμα σακχαρόζης η μέγιστη τιμή της ανήλθε στα 19,62 g/L, σε υπόστρωμα μελάσας-γλυκερόλης στα

29,42 g/L και σε υπόστρωμα μελάσας στα 31,86 g/L γεγονός που χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα σημαντικό αφού μία ζύμωση αποκτά βιομηχανικό ενδιαφέρον όταν φέρει παραγωγή βιομάζας άνω των 30 g/L (Παπανικολάου,σημειώσεις παραδόσεων, 2014).

Στον ακόλουθο πίνακα 5 εμφανίζονται συγκριτικά αποτελέσματα παραγωγής βιομάζας, μικροβιακού λίπους και γ-λινολενικού οξέος (GLA) από διάφορους ελαιογόνους Ζυγομύκητες, στον οποίο περιλαμβάνονται και τα σημαντικότερα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Πίνακας 5. Παραγωγή κυτταρικής μάζας, ενδοκυτταρικού λίπους και γ-λινολενικού οξέος από διάφορα είδη ζυγομυκήτων κατά την καλλιέργεια τους σε ζυμώσεις βύθου και σε διαφορετικά είδη υποστρωμάτων.

Στέλεχος	Υπόστρωμα	X (g/L)	Lmax (g/L)	Y _{L/X} %	GLA (mg/L)	Πηγή
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Ζάχαρη	17,6	3,1	18	310	Chatzifragkou <i>et al.</i> , 2010
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Μελάσα	12,1	3,8	32	490	Chatzifragkou <i>et al.</i> , 2010
<i>Mortierella isabellina</i>	Ζάχαρη	5,2	0,48	9	32	Chatzifragkou <i>et al.</i> , 2010
<i>Mortierella isabellina</i>	Μελάσα	11,3	4,8	42	168	Chatzifragkou <i>et al.</i> , 2010
<i>Mucor sp.</i>	Τυρόγαλα	15,8	1,46	9,21	169,4	Vamvakaki <i>et al.</i> , 2009
<i>Thamnidium elegans</i>	Γλυκόζη 100 (g/L)	31,9	15	47	909,6	Zikou <i>et al.</i> , 2013
<i>Thamnidium elegans</i>	Ξυλόζη	21,4	8,9	41,8	487	Zikou <i>et al.</i> , 2013
<i>Thamnidium elegans</i>	Γλυκόζη & Ξυλόζη	27,4	12,6	45,9	936	Zikou <i>et al.</i> , 2013
<i>Thamnidium elegans</i>	Γλυκόζη 30 (g/L)	>4,8	4,56	81,7	178	Bellou <i>et al.</i> , 2013
<i>Thamnidium elegans</i>	Γλυκόζη & Κασιγάρος	7	2,91	49	47	Bellou <i>et al.</i> , 2013
<i>Thamnidium elegans</i>	Κασιγάρος	3,9	2,76	64	75	Bellou <i>et al.</i> , 2013
<i>Thamnidium elegans</i>	Γλυκερόλη	16,6	11,6	70	-	Papanikolaou & Aggelis, 2011
<i>Thamnidium elegans</i>	Μελάσα	28,9	4,41	15,2	766	Παρούσα Μελέτη
<i>Thamnidium elegans</i>	Ζάχαρη	19,6	7,7	39	440	Παρούσα Μελέτη
<i>Thamnidium elegans</i>	Μελάσα & Γλυκερόλη	28,4	13,3	47	998	Παρούσα Μελέτη

Κατά την καλλιέργεια του συγκεκριμένου στελέχους σε υπόστρωμα γλυκόζης, ξυλόζης και συνδυασμού γλυκόζης και ξυλόζης (Πίνακας 5) σημειώθηκε παραγωγή βιομάζας 31,9 g/L, 21,4 g/L και 27,4 g/L αντίστοιχα η οποία ομοιάζει με την παραγωγή βιομάζας των βιομεταροπών που έλαβαν χώρα στην παρούσα μελέτη. Ακόμη κατά την καλλιέργεια του εν λόγω ζυγομύκητα σε υπόστρωμα γλυκερόλης, κατσίγαρου και γλυκόζης-κατσίγαρου παρατηρήθηκε παραγωγή βιομάζας 16,6 g/L 3,9 g/L και 7 g/L οι οποίες χαρακτηρίζονται χαμηλότερες σε σχέση με την παραγωγή βιομάζας των βιομεταροπών που έλαβαν χώρα στην παρούσα μελέτη. Συγκριτικά με την καλλιέργεια των ζυγομύκητων *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella isabellina* σε υπόστρωμα μελάσας καθώς και σε υπόστρωμα ζάχαρης στην παρούσα μελέτη το στέλεχος *Thamnidium elegans* παρουσίασε υψηλότερη παραγωγή μικροβιακής μάζας κατά την καλλιέργεια του σε όμοια υποστρώματα (Πίνακας 5). Η βιομάζα αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ζωοτροφών, ή ακόμη και ως συμπλήρωμα για τη διατροφή του ανθρώπου, δοθέντος του γεγονότος ότι περιέχει λιπαρά οξέα (και ιδιαίτερα το γ-λινολενικό οξύ) με υψηλό φαρμακευτικό και διατροφικό ενδιαφέρον (Vamvakaki et al., 2009).

Σε όλες τις βιομετατροπές που πραγματοποιήθηκαν σημειώθηκαν υψηλοί συντελεστές απόδοσης βιομάζας-υποστρώματος. Ο μέγιστος επιτευχθείς συντελεστής απόδοσης της τάξης των 0.58 g παραγόμενης ξηράς βιομάζας ανά 1 g καταναλισκομένου ισοδυνάμου σακχάρου (αναλωθέν σάκχαρο και αναλωθείσα πρωτεΐνη) ο οποίος παρατηρήθηκε κατά την βιομετατροπή του μικροοργανισμού με υπόστρωμα 100 g/L μελάσας και χαρακτηρίζεται από τους πιο υψηλούς που έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Ο μικρότερος επιτευχθείς συντελεστής απόδοσης της τάξης των 0.32 g παραγόμενης ξηράς βιομάζας ανά 1 g καταναλισκομένου ισοδυνάμου σακχάρου ο οποίος παρατηρήθηκε κατά την βιομετατροπή του μικροοργανισμού με υπόστρωμα 50 g/L μελάσας-40 g/L γλυκερόλης. Κατά την καλλιέργεια του συγκεκριμένου στελέχους σε υπόστρωμα γλυκόζης, ξυλόζης και συνδυασμού γλυκόζης και ξυλόζης σημειώθηκαν συντελεστές απόδοσης βιομάζας-υποστρώματος περί των 31%, 24% και 27% αντίστοιχα (Zίκου et al., 2013) οι οποίοι χαρακτηρίζονται χαμηλότεροι σε σχέση με τις τιμές συντελεστών απόδοσης-βιομάζας των βιομεταροπών που έλαβαν χώρα στην παρούσα μελέτη. Ακόμη κατά την καλλιέργεια του εν λόγω ζυγομύκητα σε υπόστρωμα κατσίγαρου και γλυκόζης-κατσίγαρου (Bellou et al., 2013) σημειώθηκαν επίσης χαμηλότεροι συντελεστές απόδοσης βιομάζας-υποστρώματος βιομάζας σε σχέση με τις τιμές συντελεστών απόδοσης-βιομάζας των βιομεταροπών που έλαβαν χώρα στην παρούσα μελέτη. Συγκριτικά με την καλλιέργεια των ζυγομύκητων *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella isabellina* σε υπόστρωμα μελάσας καθώς και σε υπόστρωμα ζάχαρης (Chatzifragkou et al., 2010) στην παρούσα μελέτη το στέλεχος *Thamnidium elegans* παρουσίασε υψηλότερους συντελεστές απόδοσης βιομάζας-υποστρώματος κατά την καλλιέργεια του σε όμοια υποστρώματα. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, τεκνύεται ότι το συγκεκριμένο στέλεχος, καλλιεργούμενο σε μέσο αύξησης με βάση τη μελάσα, την εμπορική ζάχαρη και τον συνδυασμό μελάσας-γλυκερόλης παρουσίασε από τους υψηλότερους συντελεστές απόδοσης βιομάζας-υποστρώματος συγκριτικά με την καλλιέργεια του σε διαφορετικά υποστρώματα

αλλά και σε σύγκριση με άλλους ζυμομύκητες κατά την καλλιέργεια τους σε συναφή υποστρώματα.

Αναφορικά με την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους αξιοσημείωτο χαρακτηρίζεται το γεγονός στις ζυμώσεις με υπόστρωμα TSo: 50 g/L, 100 g/L, και 120 g/L μελάσας κατ' ουσία δεν εμφανίστηκε σημαντική συσσώρευση λίπους εντός των μυκηλιακών δομών (το μέγιστο λίπος επί ξηράς μάζας $Y_{L/x}$ δεν ξεπέρασε την τιμή του 17 % w/w ενώ οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί συσσωρεύουν λίπος με $Y_{L/x}$ μεγαλύτερο του 20% w/w (Ratledge, 1994; Ratledge *et al.*, 2005; Αγγελής, 2007). Συγκεκριμένα η βιοχημική συμπεριφορά του *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε υπόστρωμα μελάσας ως μόνης πηγής άνθρακα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 50 g/L και 10 g/L πρωτεΐνης ομοιάζει σε σημαντικό βαθμό με την καλλιέργεια του ζυγομύκητα *Mucor* sp LGAM 366 ο οποίος καλλιεργούμενος σε υπόστρωμα με βάση το απόβλητο τυρόγαλα (Vamvakaki *et al.*, 2009) το οποίο χαρακτηριζόταν από υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών δεν παρουσίασε σημαντική συσσώρευση λίπους εντός των μυκηλιακών δομών φέροντας μέγιστη παραγωγή λίπους περί των 1,46 g/L και συντελεστή απόδοσης λίπους - βιομάζας $Y_{L/x} = 9,21$ % w/w. Είναι προφανές ότι η υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης εκ του υποστρώματος αφενός ευνοήσαν αρκετά την παραγωγή μικροβιακής μάζας αλλά αφετέρου αποτέλεσαν τροχοπέδη στην διαδικασία της λιποσυσσώρευσης.

Η αύξηση του μύκητα *Thamnidium elegans* σε θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα το συνδυασμό μελάσας-γλυκερόλης εμφάνισε ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά τη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους (13,3 g/L) φέροντας μέγιστο λίπος επί ξηράς μάζας περί του 47%. Επίσης κατά την βιομετατροπή του εν λόγω μύκητα σε υπόστρωμα που περιείχε σακχαρόζη ως μόνη πηγή άνθρακα τόσο η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους περί των 7,67 g/L, όσο και το ποσοστό λίπους επί ξηράς μάζας περί του 39% ήταν ελπιδοφόρα και άμεσα συγκρίσιμη με την διεθνή βιβλιογραφία όπου αναφέρεται η καλλιέργεια του εν λόγω μύκητα σε υπόστρωμα γλυκόζης, ξυλόζης και συνδυασμού αυτών (Zikou *et al.*, 2013) όπου ο συντελεστής απόδοσης λίπους επί ξηράς μάζας φέρει την μέγιστη τιμή του περί του 47% (κατά την καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα γλυκόζης) και ταυτίζεται απολύτως με των συντελεστή απόδοσης λίπους επί ξηράς μάζας της βιομετατροπής με πηγή άνθρακα το συνδυασμό μελάσας-γλυκερόλης που έλαβε χώρα στην παρούσα μελέτη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τους Panikolaou & Aggelis (2011), κατά την καλλιέργεια του συγκεκριμένου στελέχους σε υπόστρωμα με μόνη πηγή άνθρακα την γλυκερόλη το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς μάζας ήταν περί του 70% γεγονός που υποδεικνύει αναμφισβήτητα ότι ο συνδυασμός υποστρώματος μελάσας-γλυκερόλης στην παρούσα μελέτη ευνόησε την αύξηση της λιποπεριεκτικότητας. Ωστόσο σύμφωνα με τον πίνακα 5, ο επόμενος μέγιστος συντελεστής απόδοσης λίπους επί ξηράς μάζας που έχει αναφερθεί μέχρι τώρα στη διεθνή βιβλιογραφία είναι περί του 64% κατά την καλλιέργεια του συγκεκριμένου στελέχους σε υπόστρωμα με μόνη πηγή άνθρακα τον κατσίγαρο (OMW- απόβλητο ελαιουργείων).

Ακόμη σε αντιπαράθεση με την καλλιέργεια των ζυγομύκητων *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella isabellina* σε υπόστρωμα μελάσας (Chatzifragkou *et al.*, 2010) στην παρούσα μελέτη το στέλεχος *Thamnidium elegans* παρουσίασε χαμηλότερους συντελεστές απόδοσης λίπους επί ξηράς καλλιεργούμενος σε όμοιο

υπόστρωμα γεγονός που δείχνει ότι η υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών εκ του υποστρώματος επηρέασε αρνητικά την διαδικασία της λιποσυσώρευσης.

Αντιθέτως σε σύγκριση με την καλλιέργεια των ζυγομύκητων *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella isabellina* σε υπόστρωμα ζάχαρης (Chatzifragkou *et al.*, 2010) στην παρούσα μελέτη το στέλεχος *Thamnidium elegans* παρουσίασε σημαντικά υψηλότερο συντελεστή απόδοσης λίπους επί ξηράς μάζας, καλλιεργούμενος σε όμοιο υπόστρωμα περί του 39%.

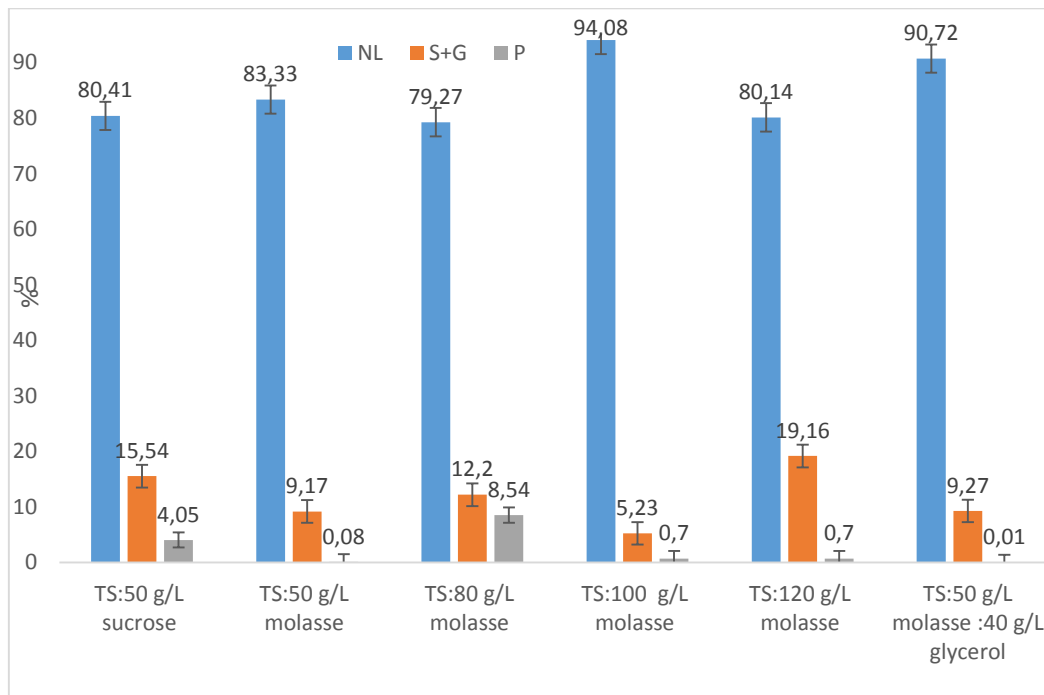
Συγκρίνοντας τις βιομετατροπές που έλαβαν χώρα με υπόστρωμα 50 g/L μελάσας και 50 g/L σακχαρόζης ενώ πρόκειται για συναφή υποστρώματα αφού το κύριο σάκχαρο που περιέχεται στη μελάσα είναι η σακχαρόζη και έχοντας την ίδια συγκέντρωση σακχάρων θα έπρεπε να σημειωθεί παρόμοιος συντελεστής απόδοσης λίπους επί ξηράς μάζας. Η διαφορά των δύο υποστρωμάτων έγκειται στο γεγονός ότι η συγκεκριμένη μελάσα περιείχε υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών. Ενώ λοιπόν και τα δύο υποστρώματα περιείχαν την ίδια συγκέντρωση σακχάρων περί των 50 g/L και την ίδια συγκέντρωση ελεύθερου αζώτου περί των 251 mg/L ο συντελεστής απόδοσης λίπους επί ξηράς μάζας του *Thamnidium elegans* στο υπόστρωμα σακχαρόζης ανήλθε περί του 39% ενώ στην αντίστοιχη συγκέντρωση σακχάρων σε υπόστρωμα μελάσας ήταν περί του 17% λόγω της παρουσίας πρωτεϊνών στο υπόστρωμα η οποία σύμφωνα με τα αποτελέσματα αποτέλεσε τροχοπέδη στην αύξηση την λιποπεριεκτικότητας του εν λόγω μύκητα.

Πολλοί ελαιόγονοι μικροοργανισμοί αποικοδομούν δηλαδή ανακαταλώνουν το συσσωρευμένο ενδοκυτταρικό λίπος μετά την εξάντληση της πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο, με αποτέλεσμα την παραγωγή βιομάζας ελεύθερης λίπους (Kavadia *et al.*, 2001; Papanikolaou *et al.*, 2004b). Στις βιομετατροπές με πηγή άνθρακα τα 50 g/L μελάσας καθώς και στα 50 g/L μελάσας :40 g/L γλυκερόλης παρατηρήθηκε ανακατανάλωση των μικροβιακών λιπιδίων κατά το τέλος της ζύμωσης με απόρροια σαφή μείωση της τιμής του συντελεστή Y_{LX} (Πίνακας 4). Το φαινόμενο της αποικοδόμησης των ενδοκυτταρικών λιπαρών οξέων κατά την εξάντληση ενός συστατικού στο υπόστρωμα έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις (Aggelis & Sourdis, 1997; Papanikolaou *et al.*, 2001; Fakas *et al.*, 2008). Γενικά, στους ελαιόγονους μικροοργανισμούς η αποικοδόμηση των τριγλυκεριδίων παρέχει στον μικροοργανισμό ενέργεια και άνθρακα που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιομάζας, ελεύθερης λίπους. Έτσι, τα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων μπορούν να διοχετεύουν στη μεταβολική οδό της β-οξειδωσης για παραγωγή ενέργειας ενώ παράγεται και βιομάζα ελεύθερη λίπους (Fakas *et al.*, 2007; 2008).

Με βάση τα κινητικά αποτελέσματα, σε υποστρώματα με αυξημένη συγκέντρωση σακχάρων (>80 g/L) και αντίστοιχα αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης, αναλώθηκε περισσότερη ποσότητα πρωτεΐνης και συγκριτικά μικρότερη ποσότητα σακχάρων με απόρροια την σχετική μείωση του Y_{LX} .

Η ανάλυση των λιπιδίων του μύκητα *Thamnidium elegans* στα επιμέρους κλάσματα, ουδέτερα (N), σφιγγο-γλυκολιπίδια (S+G) και φωσφολιπίδια (P), πραγματοποιήθηκε σε όλες τις υπό μελέτη βιομετατροπές. Τα δείγματα αντιπροσωπεύουν την παρατεταμένη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου σε κάθε βιομετατροπή. Από την εν λόγω διεργασία διαπιστώθηκε (Γράφημα 5.1) ότι το κύριο κλάσμα σε όλες τις βιομετατροπές ήταν τα ουδέτερα λιπίδια (N) με ποσοστό που

κυμαινόταν μεταξύ 79–94% (w/w επί των ολικών λιπιδίων), ενώ τα κλάσματα των σφιγγο-γλυκολιπιδίων (S+G) και των φωσφολιπιδίων (P) παρουσίαζαν ποσοστά μεταξύ 5,2–19,2% και 0,01–8,5% αντίστοιχα. Επομένως η περιεκτικότητα του μυκηλίου σε λιπίδια έδειξε ότι τα ουδέτερα λιπίδια ήταν το κυρίαρχο λιπιδιακό κλάσμα σε σχέση με τα πολικά λιπίδια (γλυκολιπίδια, σφιγγολιπίδια και φωσφολιπίδια) δεδομένο το οποίο συνάδει απόλυτα με την διεθνή βιβλιογραφία τόσο κατά την καλλιέργεια του εν λόγω στελέχους σε ποικίλα σακχαρούχα ή λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα όσο και κατά την καλλιέργεια διαφόρων ζυγομυκήτων σε συναφή μέσα αύξησης .



Γράφημα 5.1 Περιεκτικότητα (%) των κλασμάτων των ουδέτερων λιπιδίων (NL), των γλυκολιπιδίων σφιγγολιπιδίων (S+G) και φωσφολιπιδίων (P) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* CCF-1465 παρατεταμένη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου για όλες τις υπό μελέτη βιομετατροπές.

Σχετικά με τον συντελεστή απόδοσης λίπους-υποστρώματος σύμφωνα με τους Papanikolaou *et al.*, 2010), κατά την αύξηση του *Thamnidium elegans* σε θρεπτικό μέσο σε την σακχαρόζη ως μόνη πηγή άνθρακα ήταν της τάξης του 0,24 g λίπους ανά 1g καταναλισκόμενου σακχάρου ενώ κατά την καλλιέργεια του εν λόγω στελέχους σε υποστρώματα γλυκόζης ή φρουκτόζης και άλλων σακχάρων ήταν περί των 0,20g λίπους ανά 1g καταναλισκόμενου σακχάρου. Στην παρούσα μελέτη κατά την καλλιέργεια του ίδιου στελέχους σε σακχαρόζη σημειώθηκε χαμηλότερος συντελεστής απόδοσης λίπους-υποστρώματος περί του 0,17 g/g. Μέγιστος συντελεστής απόδοσης λίπους-υποστρώματος σύμφωνα με τους Papanikolaou & Aggelis (2011), άμεσα συγκρινόμενος με την αύξηση του *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα σακχαρόζης σημειώθηκε κατά την καλλιέργεια του ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* καλλιεργούμενου σε υπόστρωμα ξυλόζης ως μόνης πηγής άνθρακα (0,23 g/g).

Ο συντελεστής απόδοσης λίπους-υποστρώματος σε υπόστρωμα με βάση την καθαρή γλυκερόλη είναι περί των 0,10 g λίπους ανά 1g καταναλισκόμενης γλυκερόλης δηλαδή σε γενικά πλαίσια χαμηλότερος των αντίστοιχων συντελεστών σε

υπόστρωμα με βάση την γλυκόζη, την ξυλόζη και άλλων σακχάρων ανεξάρτητα από το είδος του ελαιογόνου μικροοργανισμού πιθανώς λόγω της σχετικά φτωχής δράσης των ενζύμων που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της μεταβολικής οδού της γλυκερόλης (κινάση της γλυκερόλης και 3-P-διυδρογενάση της γλυκερόλης), (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα γλυκερόλης-μελάσας σημειώθηκε ένας ιδιαίτερος υψηλός συντελεστής απόδοσης λίπους-υποστρώματος περί του 0,19 g/g γεγονός που υποδεικνύει, σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, ότι ο συνδυασμός των δυο αποβλήτων ως πηγή άνθρακα εκ του υποστρώματος ευνόησε ιδιαίτερα την αύξηση του εν λόγω συντελεστή. Σύμφωνα με τους Papanikolaou & Aggelis (2011), μόνο σε δύο περιπτώσεις η τιμή του $Y_{L/S}$ έλαβε τιμή υψηλότερη των 0,20 g/g κατά την καλλιέργεια του *Aspergillus sp.* και κατά την καλλιέργεια του *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα γλυκερόλης (0,22 g/g).

Πίνακας 6. Συντελεστές απόδοσης λίπους-υποστρώματος του ζυγομήκητα *Thamnidium elegans*, σε ανανεώσιμες πηγές ενέργειας της παρούσας μελέτης. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (150 grm) και θερμοκρασία $T=27^{\circ}\text{C}$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Είδος υποστρώματος	$Y_{L/S}$ (g/g)
TS:50 g/L ζάχαρη	0,17
TS:50 g/L μελάσα	0,08
TS:80 g/L μελάσα	0,15
TS:100 g/L μελάσα	0,08
TS:120 g/L μελάσα	0,08
TS:50 g/L μελάσα :40 g/L γλυκερόλη	0,19

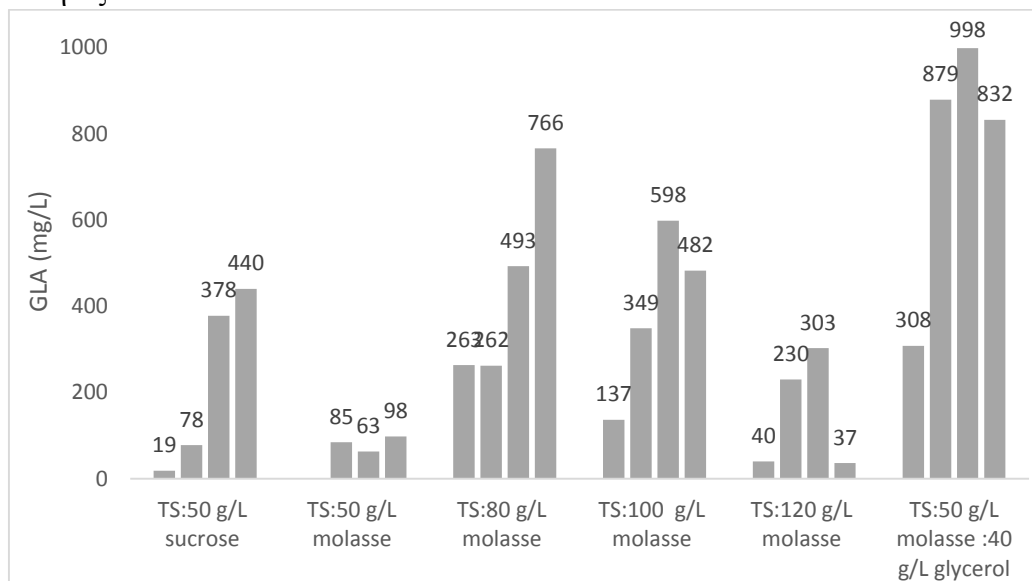
Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα 6, στις βιομετατροπές που έλαβαν χώρα στην παρούσα μελέτη με υπόστρωμα μελάσας και αρχική συγκέντρωση σακχάρων 50,100,120 g/L η τιμή των $Y_{L/S}$ (g/g) ταυτίζεται απόλυτα και χαρακτηρίζεται από τις χαμηλότερες σε σχέση με τη διεθνή βιβλιογραφία. Είναι προφανές ότι η υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης εκ του υποστρώματος αφενός ευνοήσαν αρκετά την παραγωγή μικροβιακής μάζας αλλά αφετέρου αποτέλεσαν τροχοπέδη στην διαδικασία της λιποσυσσώρευσης με άμεση συνέπεια την διατήρηση του εν λόγω συντελεστή σε χαμηλά επίπεδα. Σύμφωνα με τους Zikou *et al.* (2013), κατά την καλλιέργεια του ίδιου στελέχους σε υπόστρωμα ξυλόζης σημειώθηκε παρόμοιος συντελεστής απόδοσης ($Y_{L/S}=0,09$ g/g).

Στην βιομετατροπή που έλαβε χώρα με υπόστρωμα μελάσας με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 80 g/L η τιμή του $Y_{L/S}$ ήταν περί του 0,15 g/g και ταυτίζεται απόλυτα με την καλλιέργεια του ίδιου στελέχους σε υπόστρωμα γλυκόζης ($Y_{L/S}=0,15$ g/g), (Zikou *et al.*, 2013).

Μετά την παραλαβή και τη μεθυλίωση του ενδοκυτταρικού λίπους του ζυγομήκητα *Thamnidium elegans* CCF-1465 ακολούθησε ανάλυση της σύστασης του σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων προκύπτει ότι μικροοργανισμός παρήγαγε σημαντικές ποσότητες γ-λινολενικού οξέος (GLA, C18:3) από 19 mg/L μέχρι 998 mg/L. Σε όλες τις βιομετατροπές που έλαβαν χώρα στην παρούσα μελέτη το ποσοστό % του παραγόμενου γ-λινολενικού οξέος επί του συνόλου των λιπαρών οξέων μειώθηκε

κατά την εξέλιξη της εκάστοτε διεργασίας πλην της βιομετατροπής με υπόστρωμα μελάσας, αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L, όπου στις 251h παρουσίασε αυξομείωση με τελικό ποσοστό 10,9 % ελαφρώς μεγαλύτερο έναντι του αντίστοιχου περί των 86h (10,2%). Ωστόσο, σύμφωνα με το γράφημα 5.2, στο τέλος των βιομετατροπών με υπόστρωμα 50g/L σακχαρόζης, 50g/L και 80g/L μελάσας παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην παραγωγή του GLA περί των 440 mg/L, 98 mg/L και 766 mg/L αντίστοιχα, λόγω της αύξησης της ποσότητας του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους.

Το επικρατέστερο λιπαρό οξύ επί των ολικών λιπαρών οξέων ήταν το ελαϊκό οξύ (C18:1) με ποσοστά που κυμαίνονταν μεταξύ 18–51% και ακολούθησε το παλμιτικό (C16:0) και το λινελαϊκό οξύ (C18:2), τα οποία απαντώνταν επίσης σε σημαντικές ποσότητες.



Γράφημα 5.2 Συγκέντρωση του γ-λινολενικού οξέος εκφρασμένη σε (mg/L) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* CCF-1465 κατά την πρόιμη, την στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου για όλες τις υπό μελέτη βιομετατροπές.

Συγκριτικά με την καλλιέργεια των ζυγομύκητων *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella isabellina* σε υπόστρωμα μελάσας και ζάχαρης (Chatzifragkou *et al.*, 2010) καθώς και του *Mucor sp* (Vamvakaki *et al.*, 2009) καλλιεργούμενου σε τυρόγαλα (Πίνακας 5), το στέλεχος *Thamnidium elegans* CCF-1465 παρουσίασε μεγαλύτερη παραγωγή γ- λινολενικού οξέος. Συγκριτικά με την καλλιέργεια του ίδιου στελέχους σε υπόστρωμα ξυλόζης (Zikou *et al.*, 2013), κατσίγαρου και συνδυασμού γλυκόζης κατσίγαρου (Bellou *et al.*, 2013), στην παρούσα μελέτη κατά την καλλιέργεια του σε υπόστρωμα μελάσας και συνδυασμού μελάσας-γλυκερόλης σημειώθηκε μεγαλύτερη παραγωγή γ- λινολενικού οξέος. Η μέγιστη συγκέντρωση γ- λινολενικού οξέος σημειώθηκε κατά την καλλιέργεια του εν λόγω μικροοργανισμού σε υπόστρωμα μελασας-γλυκερόλης περί των 998 mg/L και αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παραγόμενου γ- λινολενικού οξέος από τον *Thamnidium elegans* CCF-1465. Σύμφωνα με τους Zikou *et al.* (2013), παρόμοιες αλλά ελαφρώς χαμηλότερες συγκεντρώσεις παραγόμενου γ- λινολενικού οξέος από το συγκεκριμένο στέλεχος σημειώθηκαν κατά την καλλιέργεια του σε υπόστρωμα

γλυκόζης, περί των 910 mg/L καθώς και σε υπόστρωμα γλυκόζης- ξυλόζης, περί των 936 mg/L.

Επιπλέον στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS- Intracellular Polysaccharides). Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, διάφορα γένη ζυγομυκήτων όπως *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia* και *Thamnidium* έχουν μελετηθεί και είναι ιδιαίτερα σημαντικά εξαιτίας της ικανότητας τους να προκαλούν μυκητιάσεις στον άνθρωπο (Marchevsky *et al.*, 1980; Ruiters *et al.*, 1991). Οι ανοσοχημικές ιδιότητες τόσο των ενδοπολυσακχαριτών όσο και των εξωπαλυσακχαριτών των εν λόγω μυκήτων έχουν καθοριστεί από τον Miyazaki και τους συνεργάτες του (1972,1977,1977,1980) και έχουν προταθεί να χρησιμοποιηθούν στην ανοσολογική ανίχνευση των μυκήτων. Αντίθετα σύμφωνα με τους Nie *et al.* (2013), οι ανώτεροι μύκητες του γένους *Ganoderma* περιέχουν πολυσακχαρίτες οι οποίοι θεωρούνται από τις σημαντικότερες βιοδραστικές ουσίες και η απομόνωση, τα δομικά χαρακτηριστικά και βίο-ενεργές ουσίες έχουν ερευνηθεί εκτενώς κατά τις τρεις τελευταίες δεκαετίες. Οι α- ή β- (1-3),(1-6) γλυκάνες, και ετεροσακχαρίτες με διαφορετικούς συνδυασμούς σε γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, φρουκτόζη, καθώς και η αραβινόζη εξάγονται από διαφορετικά είδη και έχουν εμφανίσει διάφορες σημαντικές βιοδραστικές ιδιότητες, όπως ανοσορυθμιστικές, κατά των όγκων, αντιοξειδωτικές, ηπατοπροστατευτικές και αντί-υπερτασικές.

Η αύξηση του μύκητα *Thamnidium elegans* CCF-1465 σε θρεπτικό μέσο με πηγές άνθρακα τη μελάσα, την ζάχαρη και το συνδυασμό μελάσας-γλυκερόλης εμφάνισε ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά τη συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών περί των 2,41-7,37 g/L. Η μικρότερη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκε κατά την αύξηση του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα ζάχαρης (2,76 g/L) όπου αντίστοιχα παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους περί των 7,67 g/L. Αντίστοιχα η μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκε κατά την αύξηση του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα μελάσας με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 100 g/L όπου δεν παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους περί των 3,96 g/L.

Επίσης πριν το τέλος των βιομετατροπών που πραγματοποιήθηκαν με υπόστρωμα TS:50 g/L και TS:100 g/L μελάσας και στο συνδυασμό μελάσας-γλυκερόλης παρατηρήθηκε μείωση δηλαδή ανακατανάλωση των ενδροπολυσακχαριτών η οποία συνοδεύτηκε με ταυτόχρονη αύξηση της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους. Το γεγονός της ανακατανάλωσης των ενδοπολυσακχαριτών δύναται να συνδέεται με την εξάντληση της πηγής άνθρακα εκ του υποστρώματος η οποία πιθανόν να μην επαρκούσε για να καλύψει τις βιοσυνθετικές ανάγκες του μικροοργανισμού. Όσο αφορά τον ποιοτικό τους προσδιορισμό, στις βιομετατροπές που έλαβαν χώρα με υπόστρωμα την μελάσα και την ζάχαρη τα ενδοπολυσακχαρίδια συνίστανται από δομικές μονάδες γλυκόζης και φρουκτόζης ενώ στην περίπτωση του υποστρώματος μελάσας-γλυκερόλης ανιχνεύτηκαν δομικές μονάδες γλυκόζης και φρουκτόζης.

Η χρήση της μελάσας ως υπόστρωμα και ως συνυπόστρωμα, κατά τον συνδυασμό υποστρώματος μελάσας-γλυκερόλης, για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών οι οποίοι αποτελούν βιοτεχνολογικό εργαλείο στα χέρια των ερευνητών σκοπεύει στην βιοεξυγίανση της, δεδομένου ότι ακόμη ένας στόχος ήταν η απορρύπανση του αποβλήτου (μείωση συνεπώς των ρυπογόνων οργανικών συστατικών αυτού) και η

παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας κατά την καλλιέργεια του μύκητα σε αυτό. Με βάση τις χημικές αναλύσεις, η χρησιμοποιούμενη μελάσα περιείχε σακχαρόζη (45-49%) και ελεύθερη γλυκόζη και φρουκτόζη σε μικρότερες ποσότητες και πρωτεΐνη σε αρχικές συγκεντρώσεις των 10 g/L και άνω συνεπώς εν μέρει το ρυπαντικό φορτίο του αποβλήτου προερχόταν από αυτά τα δυο συστατικά. Επιπλέον το εντόνως σκούρο χρώμα της μελάσας οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία των μελανοϊδινών και με συνέπεια η απόρριψη της στον εδαφικό και υδροφόρο ορίζοντα να την καθιστά παράγοντα τοξικότητας και ρύπανσης του περιβάλλοντος.

Ο αποχρωματισμός της μελάσας οφείλεται στην ικανότητα του μικροοργανισμού να διασπά τις μελανοϊδίνες καθώς και στην δυνατότητα προσρόφησης των μορίων αυτών από την του κυτταρική μεμβράνη. Στη βιβλιογραφία, γενικά σε ό,τι αφορά τον αποχρωματισμό της μελάσας έχουν μελετηθεί κυρίως στελέχη των βασιδιομυκήτων *Phanerochaete chrysosporium* και *Trametes versicolor* οι οποίοι διαθέτουν ένζυμα σχετιζόμενα με την αποικοδόμηση της λιγνίνης (π.χ. υπεροξειδάσες του μαγγανίου, υπεροξειδάσες της λιγνίνης, λακκάσες) υπεύθυνα για την διάσπαση των μορίων της λιγνίνης (Αγγελής, 2007). Το σκούρο χρώμα της μελάσας οφείλεται, όπως ήδη αναφέρθηκε, σε μόρια τύπου μελανοϊδινών, των οποίων η χημική σύσταση μοιάζει με τις λιγνίνες, ως εκ τούτου τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για τη βιοδιάσπαση των συστατικών αυτών με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του αποβλήτου. Σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη κατά την καλλιέργεια του ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* σε υπόστρωμα μελάσας σημειώθηκε αποχρωματισμός του υποστρώματος περί του 75% (Chatzifragkou *et al.*, 2010). Στην παρούσα μελέτη κατά την καλλιέργεια του *Thamnidium elegans* CCF-1465 σε μέσα αύξησης με τη μελάσα ως μόνη πηγή άνθρακα σημειώθηκε αποχρωματισμός 37,2-69% ενώ κατά την καλλιέργειά του σε υπόστρωμα μελάσας-γλυκερόλης σημειώθηκε αποχρωματισμός περί του 33%.

Ολοκληρώνοντας πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμπερτάσης σε όλες τις βιομετατροπές που έλαβαν χώρα όπου η μέγιστη τιμή της ήταν 0,32 U/mL κατά την καλλιέργεια του *Thamnidium elegans* CCF-1465 σε υπόστρωμα μελάσας, αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 100 g/L. Σύμφωνα με τους Chatzifragkou *et al.* (2010), κατά την καλλιέργεια του ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* σε υπόστρωμα μελάσας η μέγιστη τιμή ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμπερτάσης ήταν 0,5 U/mL δηλαδή ελαφρώς υψηλότερη από την αντίστοιχη του *Thamnidium elegans* CCF-1465 στην παρούσα μελέτη.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω τεκμάρεται ότι η βιοτεχνολογική αξιοποίηση της μελάσας με τη χρήση του μικροοργανισμού *Thamnidium elegans* CCF-1465 εμφανίζει ενδιαφέρον τόσο από οικολογικής όσο και από βιομηχανικής πλευράς. Αν και στις βιομετατροπές με υπόστρωμα την μελάσα και αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων 50, 100 και 120 g/L δεν σημειώθηκε σημαντική παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους οι βιομετατροπές με υπόστρωμα ζάχαρης, μελάσας αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και μελάσας-γλυκερόλης χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερως σημαντική παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη στη διεθνή βιβλιογραφία που ασχολείται με τη χρήση της μελάσας ως υπόστρωμα, είτε ως μόνη πηγή άνθρακα είτε ως μίγμα αυτής με την γλυκερόλη, για την καλλιέργεια του ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Papanikolaou & Aggelis (2011), μόνο μερικές έρευνες έχουν

δείξει ότι η γλυκερόλη έχει χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα ή ως συνυπόστρωμα σε ζυμώσεις για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών με στόχο την παραγωγή μικροβιακού λίπους. Ακόμη έχει πραγματοποιηθεί συγκριτική αξιολόγηση σε αρκετά στελέχη ζυγομυκήτων καλλιεργούμενα σε υπόστρωμα γλυκερόλης υπό συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή μικροβιακού λίπους (συνθήκες έλλειψης αζώτου) και διαπιστώθηκε ότι ο πιο υποσχόμενος μύκητας για την παραγωγή μικροβιακού λίπους απεδείχθη το στέλεχος *Thamnidium elegans* (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

6.Βιβλιογραφία.

1. Αγγελής Γ. (2007). Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. 1η έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλης Α.Ε., Αθήνα.
2. Παπανικολάου Σ. (2014). Αρχές Βιοτεχνολογίας Τροφίμων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις ΓΠΑ, Αθήνα.
3. Παπανικολάου Σ. (2014). Βιομηχανικές Ζυμώσεις. Πανεπιστημιακές παραδόσεις ΓΠΑ, Αθήνα.
4. Παπανικολάου Σ. (2014). Επεξεργασία Αποβλήτων Βιομηχανιών Τροφίμων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις ΓΠΑ, Αθήνα.
5. Μπεκατώρου Α. (2014). Επεξεργασία Αποβλήτων Βιομηχανιών Τροφίμων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις ΓΠΑ, Αθήνα.
6. Aggelis G. & Sourdis J. (1997). Prediction of lipid accumulation- degradation in oleaginous micro-organisms growing on vegetable oils. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72,159–165.
7. Bellou S., Makri A., Sarris D., Michos K., Rentoumi P., Celik A., Papanikolaou S., Aggelis G. (2013). The olive mill wastewater as substrate for single cell oil production by Zygomycetes. *Journal of Biotechnology*, 170, 50-59.
8. Bellou S., Triantaphyllidou I.E., Aggeli D., Elazzazy A.M., Baeshen M.N., Aggelis G. (2016). Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. *Current Opinion in Biotechnology*, 37,24-35.
9. Certik M., Baltészová L., Sajbidor J. (1997). Lipid formation and γ -linolenic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil. *Letters in Applied Microbiology* 25, 101-105.
10. Certik M., Berhan S., Sajbidor J. (1993). Lipid production and fatty acid composition of selected strains belonging to Mucorales. *Acta Biotechnology*. 13, 193-196.
11. Certik M. & Shimizu S. (1999). Biosynthesis and Regulation of Microbial Polyunsaturated Fatty Acid Production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 1-14.
12. Chandra R., Bharagava R. N., Rai V. (2008). Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation. *Bioresource Technology* 99, 4648–4660.
13. Chang I.S., Choo K.H., Lee C.H. , Pek U.H., Koh U.C., Kim S.W., Koh J.H. (1994). Application of ceramic membrane as a pre-treatment in anaerobic digestion of alcohol-distillery wastes. *Journal of Membrane Science*, 90 (1-2) ,131-139.
14. Chatzifragkou A., Fakas S., Galiotou- Panayotou M., Komaitis M., Aggelis G. & Papanikolaou S. (2010). Commercial sugars as substrates for lipid accumulation by

Cunninghamella echinulata and *Mortierella isabellina* fungi. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 1048-1057.

15. Chatzifragkou A., Makri A., Belka A., Bellou S., Mavrou M., Mastoridou M., Mystrioti P., Onjaro G., Aggelis G. & Papanikolaou S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36, 1097-1108.

16. Chen H.C. & Chang C.C. (1996). Production of γ -linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnology Progress* 12, 338-341.

17. Cheng K.K., Liu Q., Zhang J.A., Li J.P., Xu J.M., Wang G.H. (2010). Improved 2,3-butanediol production from corncob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. *Process Biochemistry*, 45,613-616.

18. Chen C.L., Qi W., Wang J.Y. (2013). Microbial cocktail for bioconversion of green waste to reducing sugars. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115, 1, 82–85.

19. Combes D. & Monsan P. (1983). Sucrose hydrolysis by invertase .Characterization of products and substrate inhibition. Elsevier Science Publishers B.V., 117, 215-22X.

20. Conti E., Stredansky M., Stredanska S., Zanetti F. (2001). γ -Linolenic acid production by solid-state fermentation of *Mucorales* strains on cereals. *Bioresource Technology* 76, 283-286.

21. Curtin L.V., (1983). Molasses-general considerations. In: *Molasses in Animal Nutrition*. National Feed Ingredients Association, West Des Moines, IA.

22. da Silva G.P., Mack M. & Contiero J. (2009). Glycerol, a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27, 30–9.

23. Deckwer W.D. (1995). Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. *Microbiology Reviews*, 16, 143–9.

24. Dharmadi Y., Murarka A. & Gonzalez R. (2006) Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*, a new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 821–9.

25. Dahiya J., Singh D., Nigam P. (2001). Decolorization of molasses wastewater by cells of *Pseudomonas fluorescens* immobilized on porous cellulose carrier. *Bioresource Technology*, 78, 111–114.

26. El-Enshasy H.A., Mohamed N.A., Farid M.A., El-Diwany A.I. (2008). Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization. *Bioresource Technology*, 99,4263–4268.

27. Evershed R.P., Bland H.A., Van Bergen P.F., Carter J.F., Horton M.C., Rowley-Conwy P.A. (1997). Volatile compounds in archaeological plant remains and the Maillard reaction during decay of organic matter. *Science*, 278, 432–433.

28. Fakas S., Bellou S., Makri A., Aggelis G.(2009). Single Cell Oil and gamma linolenic acid production by *Thamnidium elegans* grown on raw glycerol. *Microbial Conversions of Raw Glycerol*. Nova Science Publishers Inc, p. 85-99.
29. Fakas S., Galiotou-Panayotou M., Papanikolaou S., Komaitis M. & Aggelis G. (2007). Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1321–1327.
30. Fakas S., Papanikolaou S., Aggelis G., Komaitis M. & Galiotou-Panayotou M. (2006b). Bioconversion of tomato wastes hydrolysate into single-cell oil. *International Congress on Bioprocesses in Food Industries*, Patras, Greece, p 140.
31. Fakas S., Papanikolaou S., Batsos A., Galiotou-Panayotou M., Mallouchos A., Aggelis G.(2008). Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy* 33, 1-8.
32. Fakas S., Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M. & Aggelis G. (2006). Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. *Applied Microbiology and Biotechnology* ,73, 676–8.
33. FitzGibbon F., Singh D., McMullan G., Marchant R. (1998). The effect of phenolic acids and molasses spent wash concentration on distillery wastewater remediation by fungi. *Process Biochemistry*, 33, 799–803.
34. Folch J., Lees M. & Sloane-Stanley G. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 199, 833–41.
35. Gema H., Kavadia A., Dimou D., Tsagou V., Komaitis M. & Aggelis G. (2002) Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58:303–7.
36. Godbole J., (2002). Ethanol from cane molasses, *Fuel Ethanol Workshop*, Honolulu, Hawaii.
37. Godshall M. A., (1999). Removal of colorants and polysaccharides and the quality of white sugar. In: *Proceedings of Sixth, International Symposium organized by Association Andrew van Hook (AvH)*, Reims, France. 25 March. 28–35.
38. Guimarães C., Porto P., Oliveira R. & Mota M. (2005). Continuous decolourization of a sugar refinery wastewater in a modified rotating biological contactor with *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam disks. *Process Biochemistry*, 40, 535 – 540.
39. Guo X., & Ota Y., (2000). Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by a yeast (FO726A). *Journal of Applied Microbiology* 89, 107-115.
40. Horrobin, D.F.(1992). Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Progress in Lipid Research*, 31, 163-194.

41. Kavadia A., Komaitis M., Chevalot I., Blanchard F., Marc I. & Aggelis G. (2001). Lipid and γ -linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 341–346.
42. Kopsahelis N., Bosnea L., Bekatorou A., Tzia C., Kanellaki M. (2012). Alcohol production from sterilized and non-sterilized molasses by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on brewer's spent grains in two types of continuous bioreactor systems. *Biomass and Bioenergy*, 45, 87-94.
43. Kort M. J., (1979). Colour in the sugar industry. *Science and Technology*. de Birch, G. G. and Parker, K. J. (Eds.), 97-130 Applied Science, London.
44. Koutinas A., Chatzifragkou A., Kopsahelis N., Papanikolaou S., Kookos I.K. (2014). Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, 116, 566-577.
45. Koutinas A., Vlysidis A., Pleissner D., Kopsahelis N., Garcia I.L., Kookos I.K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, 43 (8), 2587-2627.
46. Kumar P. & Chandra R. (2006). Decolourisation and detoxification of synthetic molasses melanoidins by individual and mixed cultures of *Bacillus* spp. *Bioresource Technology*, 97, 2096–2102.
47. Mall I.D.& Kumar V., (1997). Removal of organic matter from distillery effluent using low cost adsorbent. *Chemical Engineering World XXXII*, 7, 89–96.
48. Meng X., Yang J., Xu X., Zhang L., Nie Q., Xian M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34, 1–5.
49. Menendez J.A., del Mar Barbacid M., Montero, S., Sevilla E., Escrich E., Solanas M., Cortes-Funes H., Colomer R. (2001). *European Journal of Cancer* 37, 402-413.
50. Metsoviti M., Paramithiotis S., Drosinos E., Skandamis P., Galiotou-Panayotou M. & Papanikolaou S. (2011). Biotechnological valorization of low-cost sugar-based media for bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *New Biotechnology*, 28, 600-608.
51. Miller, G., (1959). Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
52. Miranda P.M., Benito G.G., Cristobal N.S., Nieto C.H. (1996). Colour elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 57, 229–235.
53. Mlíčková K., Roux E., Athenstaed K., Andrea S., Daum G., Thierry Chardot T. & Nicaud J.M. (2004). Lipid Accumulation, Lipid Body Formation, and Acyl Coenzyme A Oxidases of the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3918-3924.

54. Mohana S., Acharya B.K. & Madamwar D. (2009). Review Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 12 – 25.
55. Moustogianni A., Bellou S., Triantaphyllidou I.E., Aggelis G. (2015) Feasibility of raw glycerol conversion into single cell oil by zygomycetes under non-aseptic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 112, 827–831.
56. Mu Y., Teng H., Zhang DJ., Wang W. & Xiu Z.L. (2006). Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol biodiesel preparations. *Biotechnology Letters*, 28, 1755–1759.
57. Nie S., Zhang h., Li W., Xien M. (2013). Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation ,structure and bioactivities. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 1, 10-20.
58. Oliveira D.P., Oliveira L.E.M., Filho N.D. (2006). Optimization of invertase assay conditions in rubber tree plants (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Revista Árvore* , 30 no.5.
59. Pant D. & Adholeya A. (2007). Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. *Bioresource Technology*, 98, 2321–2334.
60. Painter T.J. (1998). Carbohydrates polymers in food preservation: an intergrated view of the maillard reaction with special reference to discoveries of preserved foods in Sphagnum-dominated peat bogs. *Carbohydrate Polymers*, 36, 335-347.
61. Papanikolaou S. & Aggelis G. (2009). Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology*, 21, 83-87.
62. Papanikolaou S. & Aggelis G. (2010). *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, (6), 639–654.
63. Papanikolaou S. & Aggelis G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 1031-1051.
64. Papanikolaou S., Chevalot I., Komaitis M., Aggelis G. & Marc I. (2001). Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek* 80, 215–224.
65. Papanikolaou S., Diamantopoulou P., Chatzifragkou A., Philipoussis A., Aggelis G. (2010). Suitability of low-cost sugars as substrates for lipid production by the fungus *Thamnidium elegans*. *Energy Fuels*, 24, 4078-4086.
66. Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Fakas S., Komaitis M., Aggelis G., (2007). Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 1060-1070.

67. Papanikolaou S., Sarantou S., Komaitis M. & Aggelis G. (2004). Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 867–75.
68. Pena M., Coca, M., Gonzalez, G., Rioja, R., & Garcia, M. T. (2003). Chemical oxidation of wastewater from molasses fermentation with ozone. *Chemosphere*, 51, 893-900.
69. Peters D. (2006). Raw Materials. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 105, 1-30.
70. Ratledge C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In: *Technological advances in improved and alternative sources of lipids*, Kamel B.S., Kakuda Y., (eds). Blackie academic and professional, London, 235-291.
71. Ratledge C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society Transaction*, 1047-1050.
72. Ratledge C., Streekstra H., Cohen Z., Fichtali, J. (2005). Down-stream processing, extraction and purification of single cell oils. In: *Single Cell Oils*, Cohen Z., Ratledge C., (Eds). AOCS Press, Champaign, Illinois, 202-219.
73. Ratledge C. & Wynn J., (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Applied Microbiology* 51, 1-51.
74. Ruiter G.A., Smid P., Lugt A.W., Boom J.H., Notermans S.H.W., Rombouts F.M. Immunogenic Extracellular Polysaccharides of Mucorales. Chapter, *Fungal Cell Wall and Immune*, 53, 169-180.
75. Sarris, D., Matsakas, L., Aggelis, G., Koutinas, A. A., Papanikolaou, S. (2014). Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under non-aseptic conditions. *Ind Crops Prod*, 56, 83-93.
76. Silvan J.M., Lagemaat J.V.D., Olano A., Castillo M.D.D. (2006). Analysis and biological properties of amino acid derivates formed by Maillard reaction in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1543–1551.
77. Stredansky M., Conti E., Stredanska S., Zanetti F. (2000). γ -Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace. *Bioresource Technology*, 73, 41-45.
78. Tondee T., Sirianuntapiboon S., Ohmomo S. (2008). Decolorization of molasses wastewater by yeast strain, *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246. *Bioresource Technology*, 99, 5511–5519.
79. Vamvakaki A.N., Kandarakis I., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Papanikolaou S. (2009). Production of microbial mass and microbial oil during growth of the mold *Mucor* sp. LGAM 366 on whey. *Greek Journal of Dairy Science and Technology*, 1, 8-26.

80. Viktoria B. & Sergei Z. (2009): Possible ways for post-treatment of biologically treated wastewater from yeast factory. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 17, 189-197.
81. Wang H.Y., Qian H. & Yao W.R. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128, 573–584.
82. Willke T.H. & Vorlop K.D. (2004). Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66,131–42.
83. Yaylayan V.A. & Kaminsky E. (1998). Isolation and structural analysis of Maillard polymers: caramel and melanoidins formation in glycine / glucose model system. *Food Chemistry* 63, 25–31.
84. Yuste AJ & Dorado MP. (2006). A neural network approach to simulate biodiesel production from waste olive oil. *Energy and Fuels*, 20, 399–402.
85. Zahari M., Ahmad K., Zakaria M.R., Ariffin H., Mokhtar M.N., Salihon J., Shirai Y., Hassan M. A. (2012). Renewable sugars from oil palm frond juice as an alternative novel fermentation feedstock for value-added products. *Bioresource Technology*, 110, 566–571.
86. Zeng Y. F., Liu Z. L. & Qin Z. Z. (2009). Decolorization of molasses fermentation wastewater by SnO(2)-catalyzed ozonation, 682-687.
87. Zikou E., Chatzifragkou A., Koutinas A.A., Papanikolaou S. (2013). Evaluating glucose and xylose as co-substrates for lipid accumulation and γ -linolenic acid biosynthesis of *Thamnidium elegans*. *Journal Applied Microbiology*, 114,1020-32. doi: 10.1111/jam.12116.